



**Sónia Ribeiro  
Veiga de Macedo**

**Efeito Hiperbárico na Hidrólise Enzimática das  
Lamas Primárias**





**Sónia Ribeiro  
Veiga de Macedo**

## **Efeito Hiperbárico na Hidrólise Enzimática das Lamas Primárias**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Dmitry Evtyuguin, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico esta dissertação ao meu irmão e aos meus pais.



## **O júri**

Presidente

**Professor Doutor Carlos Manuel Santos Silva**

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Professor Doutor Dmitry Victorovich Evtyuguin**

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Engenheiro José Luís Amaral**

Director de I&D Tecnológico do Instituto de Investigação da Floresta e do Papel (RAIZ), Eixo





*“Nada é pesado demais para quem tem asas”*

## **Agradecimentos**

Ao meu Professor e Orientador Dmitry Victorovich Evtyuguin, pelos conhecimentos e experiência transmitidos, pelo entusiasmo e disponibilidade prestados e ainda pela boa-disposição revelada ao longo desta etapa. Ao meu Orientador auxiliar, Doutor Jorge Saraiva pelos conhecimentos e entusiasmo transmitidos, acerca da tônica vanguardista do processamento por alta pressão.

Ao Instituto de Investigação da Floresta e do Papel (RAIZ) pela oportunidade de aprender e desenvolver parte do meu trabalho nas suas instalações, assim como pela disponibilidade de recursos e pela forma cuidada como fui recebida. Em particular, ao Eng. Alexandre, Eng. Gabriel e a todo o pessoal técnico. À Eng. Sara, um sentido obrigada pelo apoio e ensinamentos prestados.

À Eng. Ana Caço, Joana Mendes e Sónia Prozil pela ajuda imprescindível nos laboratórios do Departamento Tecnológico, bem como pela boa-disposição que as caracterizam. Ao Mauro e à Liliana, pelo apoio e ajuda disponibilizados no equipamento de alta pressão.

Aos meus amigos em geral, por terem contribuído de uma forma impreterivelmente importante no decurso de todo o percurso académico e, em especial, neste último ano. À Cátia, Cristiana, Leonardo, Hélder e Rui pelo acompanhamento directo nesta última jornada.

A todos, um simples obrigada chega para aqueles que reconhecem toda a sua grandeza.



## Palavras-chave

Lamas primárias, fibras celulósicas, hidrólise enzimática, celulase, tratamento hiperbárico, açúcares redutores

## Resumo

No decurso da procura activa pela rentabilidade de resíduos sólidos, provenientes das etapas de produção da indústria de pasta e papel, surge a perspectiva para a valorização energética da fracção celulósica de lamas primárias, para a produção de biocombustíveis de segunda geração. Com efeito, a partir deste trabalho pretendeu estudar-se o desempenho da hidrólise enzimática nas lamas primárias e, aplicando um pré-tratamento hiperbárico, averiguar a influência real do mesmo no desenrolar dos parâmetros em avaliação. Foi utilizada a endo celulase (EC 3.2.1.4) comercial de tipo 1,4-(1,3:1,4)- $\beta$ -D-glucano 4-glucano-hidrolase produzida pelo fungo *Tricoderma virido*. Metodologicamente, este estudo foi efectuado em três etapas: a primeira correspondeu à caracterização global da matéria-prima; na segunda etapa submeteu-se a amostra a duas sequências de pré-tratamento de lavagens ácida (com ácido sulfúrico e ácido clorídrico), para avaliar o efeito nas propriedades químicas das lamas primárias; a terceira etapa foi caracterizada por sequências combinadas de pressão e tempo de pressurização da amostra que demonstrou melhores resultados na etapa anterior, portanto, dois ensaios a 400 MPa e um outro a 500 MPa, durante 15 minutos (na íntegra e outro por ciclos de 5) e 10 minutos, respectivamente. A amostra referente à lavagem com ácido clorídrico demonstrou os melhores resultados na caracterização química, sendo utilizada nos ensaios posteriores como a amostra referência de lamas primárias. A partir desta última etapa, inferiu-se acerca do efeito hiperbárico sobre a hidrólise enzimática, através da quantificação de açúcares redutores formados. Constatou-se que em todos os ensaios realizados, este efeito foi significativo e de elevada contribuição, traduzindo-se também num impacto positivo na velocidade e extensão da hidrólise. A sequência realizada a 400 MPa durante 15 minutos revelou os resultados mais promissores, registando-se uma melhoria na ordem de 43% no acréscimo da quantidade de açúcares redutores e um aumento na velocidade inicial de reacção em 25%, comparativamente ao estudo de amostras sem pressurização prévia.



## Keywords

Primary sludge, cellulosic fibres, enzymatic hydrolysis, cellulase, high pressure processing, reducing sugars

## Abstract

During the active search for the profitability of solid waste from the production stages of pulp and paper, there is the prospect for energy recovery from the cellulosic fraction of primary sludge, in order to produce second generation biofuels. Indeed, this work intended to study the performance of the enzymatic hydrolysis in the primary sludge and, applying a high pressure pre-treatment, ascertain its real influence through the assessment of determined parameters. It was used a commercial endo cellulase enzyme (EC 3.2.1.4) of type 1,4-(1,3:1,4)- $\beta$ -D-glucan 4-glucan hydrolase produced by the fungus *Tricoderma virido*. Attending to its methodology, this study was carried out through three major stages: the first one attended to an overall characterization of raw material; at a second stage, primary sludge was submitted throughout a two sequences of an acid pre- treatment wash (with sulphuric acid and chloridric acid), in order to assess its effect on chemical properties of primary sludge; the third and last stage was characterized by a combined sequences of pressure and pressurization time, that were applied to the sample which revealed the finest results during the previous stage. Those combined sequences involved two treatments at 400 MPa, during 15 minutes (one of them at cycles of 5 minutes each) and another treatment at 500 MPa, during 10 minutes. The sample submitted to acid chloridric wash showed better outcomes, referring to chemical characterization, so that it was distinguish as a reference sample of primary sludge, performing the subsequent study. The influence of high pressure treatment over enzymatic hydrolysis was evaluated by the amount of reducing sugars formed. It was able to verify in every trial that the quoted influence was decidedly effective, increasing the amount of reducing sugars formed and promoting an affirmative impact on reaction velocity as well as in its extension. The stage of treatment at 400 MPa during 15 minutes was considered as the preeminent one, regarding its results with an improvement of 43% related to the amount of reducing sugars formed, as well as an improvement of 25% of its initial velocity of reaction, in opposition to the sample without high pressure pre-treatment.



# Índice Geral

Índice Geral .....	I
Índice de Figuras .....	III
Índice de Tabelas .....	V
Abreviaturas e Simbologias .....	VII
Introdução .....	1
Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica .....	5
1.1. Composição química da madeira de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	7
1.1.1. Celulose .....	9
1.1.2. Hemiceluloses .....	10
1.1.3. Lenhina .....	11
1.1.4. Extractáveis .....	12
1.1.5. Cinzas .....	13
1.2. Produção de Pasta e Papel .....	13
1.2.1. Cozimento da Madeira .....	14
1.2.2. Processo <i>Kraft</i> .....	15
1.2.3. Comportamento dos componentes macromoleculares de <i>E. globulus</i> no cozimento <i>kraft</i> .....	17
1.2.4. Branqueamento .....	19
1.3. Lamas Primárias .....	20
1.4. Enzimas .....	22
1.4.1. Classificação Enzimática .....	24
1.4.2. Actividade Enzimática .....	25
1.4.3. Cinética Enzimática .....	25
1.4.4. Celulase .....	27
1.5. Processamento Hiperbárico .....	28
1.5.1. Princípio de Funcionamento .....	30
1.5.2. Equipamento .....	31
1.5.3. Efeito do Tratamento Hiperbárico .....	33

<b>Capítulo 2 – Metodologia Experimental</b>	35
2.1. Caracterização Química das Lamas Primárias	36
2.1.1. Humidade	36
2.1.2. Teor de Cinzas	37
2.1.3. Teor de Carbonatos	38
2.1.4. Análise de Metais	38
2.1.5. Análise de Extractáveis	39
2.2. Caracterização LP neutralizadas com ácido sulfúrico	41
2.2.1. Teor de Lenhina	41
2.2.2. Análise de Açúcares Neutros	43
2.3. Caracterização Química LP com lavagem de ácido clorídrico	45
2.4. Determinação da recta de calibração da glucose pelo método DNS	46
2.5. Preparação da solução de celulase	47
2.6. Hidrólise Enzimática de LP	47
2.7. Hidrólise Enzimática de LP com Tratamento Hiperbárico	49
<b>Capítulo 3 – Análise e Discussão dos Resultados</b>	51
3.1. Caracterização Química das Lamas Primárias	52
3.1.1. Análise de Metais	56
3.1.2. Caracterização e Quantificação dos Açúcares Neutros	57
3.2. Hidrólise Enzimática das Lamas Primárias	58
3.2.1. Efeito do Tratamento Hiperbárico nas LP antes e após extracção com acetona	60
3.3. Influência do Tratamento Hiperbárico na Hidrólise Enzimática nas LP referência	62
3.3.1. Análise das curvas diferenciais de hidrólise enzimática	65
3.3.2. Efeito hiperbárico no melhoramento da sacarificação das LP referência	68
<b>Conclusão</b>	71
<b>Referências Bibliográficas</b>	73
<b>Apêndices</b>	1
Anexo A – Exemplos de Cálculo	2
Anexo B – Tabelas Auxiliares	5
Anexo C – Figuras Auxiliares	9



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Modelo das camadas da parede celular da célula da madeira. ....	8
<b>Figura 1.2:</b> Fórmula estereoquímica da celulose: polímero de unidades de $\beta$ -D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ . A unidade dimérica que se repete é a celobiose. ....	9
<b>Figura 1.3:</b> Diagrama representativo da constituição das células da madeira de <i>E. globulus</i> .....	10
<b>Figura 1.4:</b> Representação abreviada da estrutura mais comum das hemiceluloses de folhosas de <i>E. globulus</i> , O-acetil-4-O-metilglucurono- $\beta$ -D-xilana .....	11
<b>Figura 1.5:</b> Estrutura dos precursores da lenhina .....	11
<b>Figura 1.6:</b> Natureza cíclica do processo de cozimento <i>kraft</i> .....	17
<b>Figura 1.7:</b> Representação esquemática do processo de bloqueio da reacção de <i>peeling</i> e de <i>stopping</i> .....	18
<b>Figura 1.8:</b> Esquema de tratamento de efluentes líquidos .....	20
<b>Figura 1.9:</b> Representação do modelo chave-fechadura .....	23
<b>Figura 1.10:</b> Representação do modelo do encaixe-induzido .....	24
<b>Figura 1.11:</b> Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk. ....	27
<b>Figura 1.12:</b> Mecanismo de degradação enzimático-acção sinérgica entre endo- e exo-glucanases .....	28
<b>Figura 1. 13:</b> Representação esquemática do princípio de compressão isostática.....	31
<b>Figura 1. 14:</b> Representação esquemática do modo de geração de alta pressão por compressão directa.....	32
<b>Figura 1. 15:</b> Representação esquemática do modo de geração de alta pressão por compressão indirecta .....	32
<b>Figura 2. 1:</b> Representação da mufla de aquecimento. ....	37
<b>Figura 2. 2:</b> Digestão das lamas iniciais, na placa de aquecimento. ....	39
<b>Figura 2. 3:</b> Representação do equipamento ICP-AES. ....	39
<b>Figura 2. 4:</b> a) Representação da operação de extracção em acetona com extractor de Soxhlet de 125mL (esquerda); b) concentração do extracto no evaporador rotativo (direita).....	40
<b>Figura 2. 5:</b> Lamas iniciais secas ao ar, após extracção. ....	41
<b>Figura 2. 6:</b> a) Representação do banho de aquecimento da primeira hidrólise ácida da lenhina (esquerda) e da b) segunda hidrólise ácida (direita).....	

<b>Figura 2. 7:</b> Representação do espectrofotômetro de absorção UV-VIS. ....	43
<b>Figura 2. 8:</b> Coluna GC-FID (DB 225, 30m). ....	44
<b>Figura 2. 9:</b> Digestão das lamas primárias iniciais em solução de ácido clorídrico (HCl 5%). ....	45
<b>Figura 2. 10:</b> Lamas primárias de referência secas ao ar, após lavagem com ácido clorídrico (HCl 5%). ....	46
<b>Figura 2. 11:</b> Espectrofotômetro de absorção visível, UVmini-1240, utilizado a 540nm, com percurso óptico de 1mm. ....	47
<b>Figura 2. 12:</b> a) Montagem reaccional (esquerda); b) Centrifugadora Zentrifugen, modelo mickro 120 (direita). ....	48
<b>Figura 3.1:</b> Formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência e LP referência após extracção com acetona. ....	58
<b>Figura 3.2:</b> Formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência, LP após extracção com acetona e LP extraídas com processamento a alta pressão (400 MPa, 15 min). ....	60
<b>Figura 3.3:</b> Representação diferencial da formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência, LP extraídas e e LP extraídas com processamento a alta pressão (400 MPa, 15 min). ....	61
<b>Figura 3.4:</b> Formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência e LP referência com processamento por alta pressão (400 MPa, 15 min; 500 MPa, 10 min; 400 MPa, 5+5+5 min). ....	62
<b>Figura 3.5:</b> Representação diferencial da formação de açúcares redutores ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência e LP referência com processamento por alta pressão (400 MPa, 15 min; 500 MPa, 10 min; 400 MPa, 5+5+5 min). ....	66
<b>Figura 3.6:</b> Diferença na quantidade de açúcares redutores (AR) formados ao longo do tempo de reacção, entre LP referência e LP após processamento a 400 MPa durante 15 minutos ....	68

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Composição química da madeira de resinosas e de folhosas.....	7
<b>Tabela 1.2:</b> Composição química da madeira de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	7
<b>Tabela 2.1:</b> Características do equipamento High-pressure System U33. ....	49
<b>Tabela 2.2:</b> Combinações de tratamento hiperbárico aplicadas em cada ensaio.....	50
<b>Tabela 3.1:</b> Resultados para a caracterização química das lamas primárias iniciais. ....	52
<b>Tabela 3.2:</b> Resultados da caracterização química das lamas primárias com lavagem ácida de ácido sulfúrico e clorídrico. ....	53
<b>Tabela 3.3:</b> Presença de cátions metálicos nas amostras de lamas primárias inicial e com lavagem ácida de ácido sulfúrico e clorídrico. ....	56
<b>Tabela 3.4:</b> Presença de açúcares neutros (%m/m) nas amostras de lamas primárias com lavagem ácida de ácido sulfúrico e clorídrico. ....	57



## Abreviaturas e Simbologias

Abs	Absorvância
AR	Açúcares redutores
Ara	Arabinose
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
E	Enzima
EF	Fibrilas elementares
ES	Complexo enzima-substrato
Ex	Teor de extractáveis
Gal	Galactose
Glc	Glucose
(G)	Unidades de Guaicilpropano
[Glc]	Concentração de glucose
HDPE	Polietileno de alta densidade
HP	Alta pressão
HPP	Processamento a alta pressão
[H]	Unidades de hidrofenilpropano
IUB	União Internacional de Bioquímica
K	Constante de equilíbrio
k	Constante de reacção
Km	Constante de Michaelis – Menten
LP	Lamas Primárias
m(Glc)	Massa de glucose
m <sub>amostra húmida</sub>	Massa da amostra húmida
m <sub>amostra seca</sub>	Massa da amostra seca
Man	Manose
m <sub>balão</sub>	Massa do balão volumétrico
m <sub>cadinho</sub>	Massa do cadinho
m <sub>cadinho+LP</sub>	Massa do conjunto cadinho + lamas
m <sub>cinza</sub>	Massa de cinzas

$m_{\text{copo}}$	Massa do copo de vidro
$m_{\text{copo+LP}}$	Massa do conjunto copo + lamas
$m_{(\text{copo+LP}) \text{ b.s}}$	Massa do conjunto copo + lamas em
base seca	
$m_{\text{extractáveis}}$	Massa de extractáveis
MF	Microfibrilas
$m_{\text{LP seca}}$	Massa de lamas seca
$m_{\text{Lenhina}}$	Massa de lenhina
P	Produto
Rha	Ramnose
S	Substrato
(S)	Unidades de Seringilpropano
$[S]_0$	Concentração inicial de substrato
t	Tempo
U	Unidades de actividade enzimática
UV	Ultra violeta
V	Volume
$V_0$	Velocidade inicial de reacção
$V_{\text{Max}}$	Velocidade máxima de reacção
W	Teor de humidade
X	Teor de carbonatos
Xylp	Xilopiranose
Z	Teor de cinzas







## Introdução

A indústria da pasta e do papel detém enorme relevância no panorama económico nacional, cuja madeira de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) assume o protagonismo como a matéria-prima principal. Este material lenhocelulósico é estruturado essencialmente por uma combinação de polissacarídeos, hemiceluloses e celulose, envolvidos numa matriz de lenhina, que retém as fibras celulósicas desejáveis.

A repercussão global do consumo desmesurado de energia tem sido cada vez mais evidente nos últimos anos, pelo crescimento das taxas de CO<sub>2</sub> acumuladas na atmosfera, particularmente causado por um aumento na queima antropogénica de combustíveis fósseis. Tem sido demonstrado que, a atenuação destes efeitos pode ser alcançada através da correcta articulação ou substituição de combustíveis de transporte à base de petróleo por biocombustível, produzindo menos emissões prejudiciais, nomeadamente o etanol (Lai, 2010).

A produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos, vulgarmente denominado por bioetanol, é um cenário que assume cada vez mais uma maior exequibilidade, motivando a ideológica demanda pelo avanço tecnológico para este fim (Moritz, John William, 1994). No decurso desses avanços, tem sido demonstrado que o bioetanol apresenta uma proporção de energia mais favorável, do que aquela proveniente de fontes de amido ou de açúcar (Keeney and DeLuca 1992; Lorenz, Morris *et al.* 1995)

As lamas primárias são resíduos sólidos obtidos na purificação dos efluentes residuais da indústria da pasta e do papel e constituídas essencialmente por fibras celulósicas (50-70%) e compostos inorgânicos (30-50%) (Scott, 1995). As lamas resultam da recuperação dos filtrados das lavagens das pastas, provenientes das fases de cozimento e branqueamento, assim como dos filtrados das máquinas do papel. Os efluentes de produção a serem tratados são recolhidos num clarificador primário, do qual resultam as lamas primárias.

As fracções de hemicelulose e celulose necessitam de ser primeiramente hidrolisadas para depois se produzirem açúcares fermentáveis, sendo que são subsequentemente fermentados por estirpes de leveduras produtoras de etanol. A hidrólise enzimática, utilizando celulase, evidencia vantagens sobre métodos químicos de degradação (por

exemplo, hidrólise ácida), na medida em que são altamente específicas e compatíveis com o processo de fermentação (Moritz, 1994). Não obstante da adopção da hidrólise enzimática como alternativa sustentável, os custos inerentes aos sistemas enzimáticos são elevados, representando um factor de ponderação na sua aplicação (Graça, 2010).

No decurso da hidrólise da celulose, sendo este um polímero amorfo-cristalino, várias condicionantes acompanham este processo devido à dificuldade no acesso aos domínios cristalinos, conduzindo a baixos níveis de eficiência da hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos. Com o intuito de suprir esta desvantagem, foram desenvolvidas inúmeras técnicas de pré-tratamento. A tecnologia de processamento por alta pressão (*High Pressure Process, HPP*), largamente empregue na indústria alimentar para a preservação de alimentos, surge como uma potencial ferramenta para tratamentos em pastas celulósicas (Ferreira *et al.*, 2011).

O aproveitamento das lamas primárias por bioprocessamento é extremamente difícil. Um dos objectivos primordiais deste trabalho será a avaliação de um efeito de pré-tratamento por alta pressão (400-500 MPa) das lamas primárias, sobre o desempenho da hidrólise enzimática, empregando como enzima a celulase. Este pré-tratamento poderá aumentar a aptidão para hidrólise enzimática, promovendo uma melhor e maior acessibilidade da enzima nos domínios cristalinos da celulose das lamas. Por conseguinte, surge como principal finalidade a sacarificação deste resíduo rico em fibras celulósicas para a sua integração em produtos de valor acrescentado, nomeadamente traçando o percurso da valorização energética da fracção celulósica das lamas primárias para a produção de biocombustíveis de segunda geração.

O presente trabalho é estruturado em quatro capítulos e uma secção de apêndice. O primeiro capítulo consiste numa revisão bibliográfica, onde se destacam quatro temas principais: a composição química da madeira de *Eucalyptus globulus*, bem como a abordagem aos seus componentes macromoleculares e de menor peso molecular; breve introdução ao processo de produção de pasta de papel; definição da temática das lamas primárias e abordagem ao nível da sua importância na indústria de pasta e papel; introdução à tecnologia de processamento por alta pressão. No segundo capítulo são conhecidos os métodos e procedimentos experimentais, atendendo às normas vigentes em cada caso, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho e a obtenção de resultados. O terceiro capítulo é dedicado à análise cuidada dos dados recolhidos, assim como a

discussão dos mesmos, indicando sempre que possível futuras propostas para a refinação dos resultados obtidos. No último capítulo são elaboradas as principais conclusões de todo o trabalho realizado.



## **Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica**

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizou-se como matéria-prima, as lamas primárias dos efluentes resultantes da etapa de cozimento de pasta *kraft*, a partir da madeira de *Eucalyptus globulus*, e cedida pela fábrica integrada da Portucel de Setúbal.

Neste capítulo apresentar-se-á uma breve descrição da morfologia e composição química da madeira de *Eucalyptus globulus*, bem como o processo industrial envolvido na produção de pasta e papel. Atendendo ao objectivo primordial deste trabalho, demonstrar-se-á com relativo detalhe, toda a tónica associada aos fundamentos hiperbáricos e à actividade enzimática, bem como os efeitos imprimidos na fibra celulósica das lamas primárias.

A madeira é um material biocelular (lenhocelulósico) heterogéneo, definido pela articulação dos seus componentes microscópicos, ultramicroscópicos, macroscópicos e químicos. É constituída por células longas (fibras) e ocas, que perderam a sua actividade biológica, encontrando-se predominantemente alinhadas longitudinalmente (Sjöström,1981; Henriksson *et al*,2009).

Existem dois grandes grupos de madeiras, divididos a partir das suas raízes filogenéticas, estrutura anatómica e composição química: as folhosas (*hardwood*), como o eucalipto, carvalho, castanheiro e as resinosas (*softwood*). Quimicamente, as folhosas distinguem-se (Tabela 1.1) das resinosas por uma maior proporção de polissacarídeos, relativamente à lenhina, e por uma composição diferente das hemiceluloses, relativamente aos açúcares constituintes. No entanto, morfologicamente evidenciam em comum células orientadas segundo o eixo longitudinal (axial) e algumas células orientadas segundo o eixo transversal (radial), com a função de condução e armazenamento. (Sjöström,1981; Henriksson *et al.*, 2009).

**Tabela 1.1:** Composição química da madeira de resinosas e de folhosas (adaptado, Sixta, 2006).

<b>Componentes Macromoleculares (%)</b>	<b>Resinosas</b>	<b>Folhosas</b>
<b>Celulose</b>	40-44	40-44
<b>Hemicelulose</b>	30-32	15-35
<b>Lenhina</b>	25-32	18-35

### 1.1.Composição química da madeira de *Eucalyptus globulus*

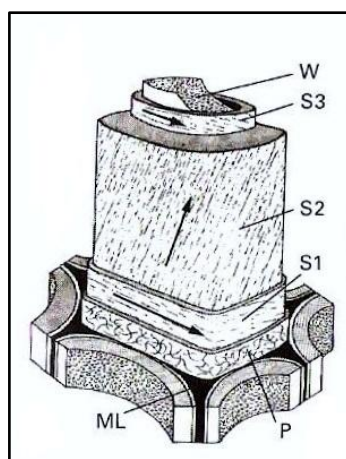
O *Eucalyptus globulus* ocupa uma posição de destaque como a espécie mais utilizada em Portugal na produção de pasta celulósica, inserindo-se no grupo de madeiras de folhosas. O conhecimento da sua morfologia e composição química é de extrema importância para averiguar o seu comportamento nas diferentes fases do processo de produção de pasta e papel. Na Tabela 1.2 encontram-se os dados relativos à composição química do *E. globulus* (Pinto *et al.* 2005).

**Tabela 1.2:** Composição química da madeira de *Eucalyptus globulus* (adaptado, Pinto *et al.* 2005).

<b>Composição da madeira de <i>Eucalyptus globulus</i> (%)</b>	
<b>Extractáveis (etOH/tol)</b>	1,72
<b>Lenhina (Klason)*</b>	22,1
<b>Monossacarídeos Neutros</b>	
<b>Glc</b>	53,4
<b>Xyl</b>	14,2
<b>Rha</b>	0,3
<b>Ara</b>	0,4
<b>Man</b>	1,1
<b>Gal</b>	1,5

\*Não corrigido para o conteúdo de polifenóis.

As células da madeira de *Eucalyptus globulus* são formadas por várias camadas de parede celular, que se dividem em parede primária, P, e secundária, S (Figura 1.1). As células individuais são ligadas entre si pela região da lamela média, ML, com elevado teor em lenhina (Henriksson *et al*,2009). A parede celular é composta por celulose, pectina e hemicelulose, envolvidas e incrustadas numa matriz de lenhina, e dividida em várias camadas que se distinguem pela orientação das microfibrilas de celulose, no sentido longitudinal e transversal. A parede primária, de espessura fina, é composta por microfibrilas de celulose, aleatoriamente orientadas, e apresenta maior teor em lenhina e pectina, conferindo consistência e coesão às fibras na madeira. A parede secundária subdivide-se em três subcamadas: a camada externa S1, cujas microfibrilas estão entrecruzadas e formam uma hélice; a camada intermédia S2, em que as microfibrilas encontram-se paralelas ao eixo longitudinal; e a camada interna S3, onde as microfibrilas dispõem-se paralelamente às situadas nas camadas exteriores (Bristow e Kolseth, 1986). A subcamada S2 assume maior relevância face às restantes duas, devido à sua considerável espessura e orientação vertical das microfibrilas, que conferem maior resistência às células de madeira e traduzem as principais propriedades físicas e mecânicas dos produtos de madeira. Existe ainda uma camada mais interna, W, designada por camara rugosa (Henriksson *et al*,2009).



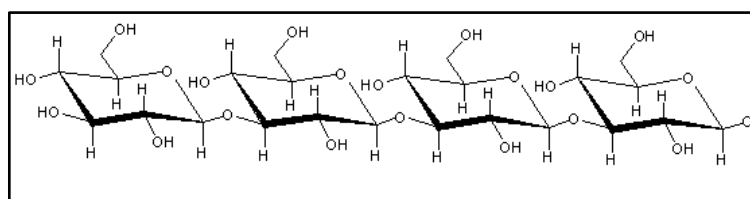
**Figura 1.1:** Modelo das camadas da parede celular da célula da madeira. (Henriksson *et al*,2009)



### 1.1.1. Celulose

O principal componente da parede celular de *E. globulus* é a celulose, um homopolímero linear, composto por unidades de  $\beta$ -D-glucopirranose conectadas por ligações glicosídicas, entre os hidroxilos do carbono 1 de um dos monómeros e do carbono 4 do monómero adjacente, portanto ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figura 1.2). O grupo hidroxilo, posicionado no carbono 1 tem carácter redutor com uma estrutura de aldeído, enquanto o grupo hidroxilo do carbono 4 tem carácter não redutor envolvido na ligação glicosídica  $\beta(1\rightarrow4)$ , pelo que a diferença entre as duas extremidades confere polaridade à celulose (Sjöström, 1993; Graça, J., 2008)

A celulose apresenta uma estrutura organizada e parcialmente cristalina, comprimento longo e grau de polimerização elevado, responsável por grande parte das propriedades da madeira.

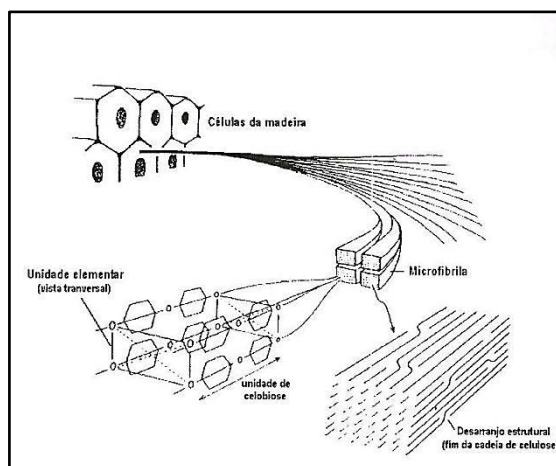


**Figura 1.2:** Fórmula estereoquímica da celulose: polímero de unidades de  $\beta$ -D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . A unidade dimérica que se repete é a celobiose.

A conformação da celulose - com todos os grupos polares em posição equatorial - permite o estabelecimento de ligações por pontes de hidrogénio inter e intramoleculares (estas últimas conferem maior estabilidade). Pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, bem como por acção de forças de van der Waals, as cadeias de celulose organizam-se em diferentes níveis hierárquicos estruturais. As fibrilas elementares, que compõem o primeiro nível de organização supramolecular, agregam-se sob a forma de microfibrilas, na qual as zonas cristalinas (cristalitos), mais coesas e estáveis, se alternam com as zonas amorfas, menos ordenadas (Graça, J., 2008; Neto e Evtyugin, 2004). As microfibrilas elementares são separadas por zonas constituídas por celulose paracristalina (que evidencia um grau intermédio entre a celulose cristalina e amorfa) ou amorfa, assim como por hemiceluloses. As microfibrilas (Figura 1.3) dispõem-se em macrofibrilas, desagregadas por uma matriz de lenhina e hemiceluloses, e estas por

sua vez, unem-se em camadas homogêneas, denominadas por lamelas, construindo as fibras celulósicas da parede celular. (Graça, J., 2008; Neto e Evtyugin, 2004).

Devido a esta estrutura amorfo-cristalina e atendendo ao carácter hidrofílico da celulose, a água só consegue penetrar nos espaços vazios intermoleculares na zona amorfa (Sjöström, 1993).

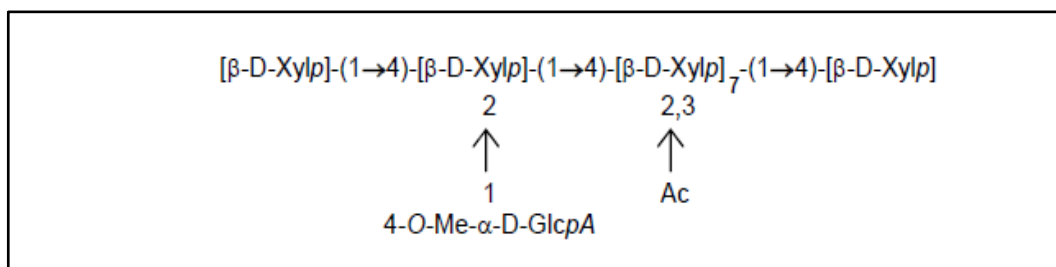
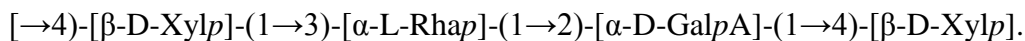


**Figura 1.3:** Diagrama representativo da constituição das células da madeira de *E. globulus* (adaptado Eaton e Hale, 1993).

### 1.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados, com grau de polimerização baixo e que, à semelhança da celulose, funcionam como material estrutural, além de servir como substância de reserva. Os açúcares principais, os monossacarídeos (Figura 1.3), que a constituem são as pentoses (D-xilose e L-arabinose), as hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), pequenas quantidades de desoxihexoses (L-ramnose e L-fucose) e menor incidência em ácidos urónicos (ácidos D-4-O-metilglucurónico, D-galacturónico e D-glucurónico) (Henriksson *et al.*, 2009). A composição das hemiceluloses depende fortemente da espécie, sendo que na madeira de *Eucalyptus globulus*, as suas hemiceluloses são constituídas maioritariamente por polissacarídeos do tipo glucuronoxilanas (Fengel e Wegener, 1989; Neto e Evtyugin, 2004). Estas xilanas (Figura 1.4) são constituídas por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-xilopirranose unidas por ligações  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , e ramificada por unidades de ácido  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurónico unidas por

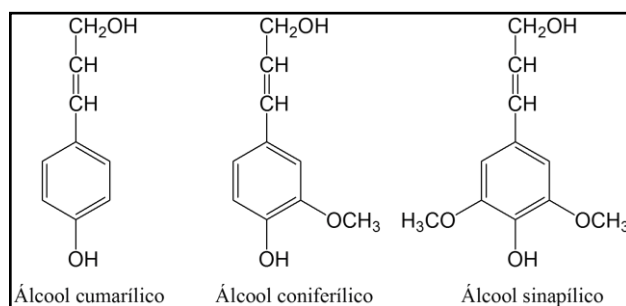
ligações  $\alpha(1\rightarrow2)$  (Graça, J., 2008). Outros conjuntos de hemiceluloses existentes em menor abundância na madeira de *Eucalyptus globulus*, são as glucomananas e pectinas. A sequência terminal das cadeias das xilanas consiste numa combinação de xilose, ramnose e ácido glucurónico, com a seguinte ordem:



**Figura 1.4:** Representação abreviada da estrutura mais comum das hemiceluloses de folhosas de *E. globulus*, *O*-acetil-4-*O*-metilglucurono- $\beta$ -D-xilana (adaptado, Evtyguin *et al.*, 2003).

### 1.1.3. Lenhina

É um heteropolímero aromático, morfologicamente amorfo com uma macro estrutura tridimensional e ramificada. A lenhina é composta por unidades derivadas do fenilpropano e que resulta da polimerização dos seus precursores, sendo responsáveis pela sua biossíntese (Figura 1.6).



**Figura 1.5:** Estrutura dos precursores da lenhina (adaptado Fengel, 1989).

Na lenhina das folhosas regista-se a presença tanto do álcool coniferílico, bem como do álcool sinapílico (na proporção aproximada de 3:1), originando unidades derivadas de siringilpropano (S), guaiacilpropano (G) e de *p*-hidrofenilpropano (H) (Henriksson *et al.*,

2009; Sjöström, 1981). A abundância relativa destas unidades na madeira de *E. globulus*, bem como o tipo de ligações entre elas (maioritariamente do tipo  $\beta$ -O-4), afectam a reactividade da lenhina nos processos de cozimento e branqueamento, respectivamente. Mais de 80% destas unidades correspondem ao tipo (S), enquanto o tipo (G) e (H) registam cerca de 10-20% e 3%, respectivamente (Pinto *et al.*, 2005).

A lenhina encontra-se localizada em maior concentração na lamela média, embora esteja distribuída pela parede celular, sendo responsável pela coesão das fibras na madeira (Neto e Evtyuguin, 2005). Durante o desenvolvimento das células, a lenhina é incorporada como o último componente na parede, interpenetrando as fibrilas e assim fortalecendo a parede celular e assumindo importância no impedimento à penetração de enzimas destrutivas na parede celular. Apesar de a lenhina ser parte integrante e necessária, a sua presença é alvo de remoção da madeira em processos de cozimento e branqueamento, para se alcançar a individualização das fibras para posterior utilização no fabrico do papel (Sjöström, 1993; Freudenberg e Neish, 1968).

#### **1.1.4. Extractáveis**

Os extractáveis são moléculas de baixo peso molecular, cuja designação advém do facto de serem passíveis de remoção da madeira através de solventes orgânicos como etanol, acetona ou diclorometano. Os componentes extractáveis subdividem-se em três grupos: compostos alifáticos (alcanos, álcoois, ácidos gordos saturados e insaturados, na forma livre ou esterificada), terpenos e terpenóides (esteróis, sendo que o mais abundante nas folhosas é o  $\beta$ -sitosterol) e compostos aromáticos (ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, lenhanos e estilbenos) (Fengel e Wegener, 1984; Sjöström, 1981).

Dos compostos aromáticos, os taninos são um grupo importante e dividem-se em taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou flobafenos. Os taninos hidrolisáveis são encontrados em folhosas, como o carvalho e o eucalipto, e os mais importantes são os galotaninos e elagitaninos, que são polímeros do ácido gálico e elágico, respectivamente. Os taninos condensados resultam da condensação de flavonóides, como a catequina ou a leucoantocianidina, e são encontrados tanto na madeira como na casca. Os flavonóides são

polifenóis compostos por unidades de difenil propano e são responsáveis pela cor de diversas madeiras.

Os terpenos são compostos geralmente responsáveis pelo odor das madeiras e que quimicamente derivam de duas ou mais unidades de isopreno. Consoante o número de unidades, assim são apelidados de monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três), diterpenos (quatro) e politerpenos (mais de oito).

Os compostos alifáticos mais frequentemente encontrados nas madeiras são gorduras, ceras e açúcares. As gorduras são ésteres do glicerol com ácidos gordos, enquanto as ceras são ésteres de álcoois de cadeia longa e ácidos gordos. Os açúcares encontrados nos extractáveis são sobretudo monossacarídeos, tais como glucose e frutose, ou dissacarídeos como a sacarose (Hon, 2007; Sixta, 2006).

#### **1.1.5. Cinzas**

As cinzas são compostas por material inorgânico resultante do processo de combustão completa de biomassa, representando cerca de 1% da madeira de biomassa. São essencialmente constituídas por sulfatos, fosfatos, silicatos, oxalatos e carbonatos de cálcio, de potássio e magnésio, embora a sua composição dependa da composição dos solos e condições climáticas, sendo cruciais para o crescimento da planta (Hakkila, 1999; Ohlsson 2004).

### **1.2. Produção de Pasta e Papel**

O processo de fabrico de pasta e papel é iniciado pelo transporte dos toros de madeira, de dimensões variáveis consoante a unidade fabril, onde são previamente seleccionados com base na qualidade física e na quantidade. Após o armazenamento dos toros ao ar livre por um período de tempo, dá-se início ao pré-tratamento que se caracteriza pelo descasque, lavagem, corte de toros e destroçamento em aparas, aumentando a área de contacto da madeira com o vapor e os produtos químicos. Por último segue-se a etapa da crivagem,

onde as aparas de menores dimensões são recolhidas e seguem para o digestor para se iniciar a etapa de cozimento; as aparas de maiores dimensões são excluídas regressam as etapas anteriores (Biermann, 1996). No cozimento ocorre o processo de deslenhificação (remoção de lenhina), que envolve várias etapas características da interacção dos agentes químicos com as espécies a dissolver (Klemm et al., 1998), obtendo-se uma pasta crua que é então lavada e submetida ao processo de branqueamento. Nesta fase, procede-se à remoção e/ou descoloração da lenhina residual, bem como à remoção de outras estruturas cromóforas (Neto e Evtuguin, 2004).

As matérias-primas mais utilizadas no fabrico de pasta para papel incluem essencialmente madeiras de resinosas e de folhosas. No grupo das folhosas, o *Eucalyptus globulus*, assume uma notória preponderância como a espécie mais utilizada em Portugal na produção de pasta celulósica e, cuja pasta *kraft* branqueada, é maioritariamente produzida também em Portugal (Neto e Evtuguin, 2004).

### **1.2.1. Cozimento da Madeira**

O processo de cozimento da madeira pode ser mecânico ou químico, em que em ambos os casos ocorre a separação das fibras celulósicas e, portanto, a dissolução/diminuição do teor de lenhina. Os processos mecânicos apresentam rendimentos elevados (cerca de 95%), enquanto os químicos apresentam rendimentos inferiores (cerca de 50%).

No cozimento mecânico, a madeira é reduzida a fibras através de etapas de trituração e refinação, com recurso a equipamentos como rotador e um refinador em disco, respectivamente. No primeiro caso, os toros de madeira são pressionados contra uma superfície de pedra, sujeita a pulverização da água. No outro caso, o refinamento é conseguido pela passagem de lascas de madeira, desde o centro para fora, e entre dois discos circulares, onde pelo menos um a trabalhar a velocidade de rotação máxima. A desintegração da madeira em pasta mecânica resulta numa ampla distribuição de tamanhos de fibras, incluindo feixes de fibras, fibras completas, fibras fragmentadas e pequenas partículas (Hon, 2007). As pastas mecânicas são difíceis de branquear e sofrem um processo de amarelecimento muito rápido. Este tipo de pastas utiliza-se, principalmente,

para papéis de baixa resistência, como por exemplo o papel de jornal (Sjöström, 1993, Clayton *et al*, 1989).

No cozimento químico, as fibras celulósicas são separadas através da remoção da lenhina (90-95%) e da degradação e dissolução parcial dos polissacarídeos (hemiceluloses e celulose) no licor negro, sob condições ácidas e/ou alcalinas (Neto e Evtyuguin, 2004). Como produtos, obtêm-se uma pasta crua constituída por celulose, uma fracção das hemiceluloses iniciais e lenhina residual (1-5%), com um rendimento aproximadamente de 45-55%. O processo de cozimento químico da madeira pode ocorrer sob condições ácidas – ao sulfito ou biossulfito, ou sob condições alcalinas – *kraft* (ou sulfato) e “soda”. Os processos mais frequentemente empregues na produção de pasta de papel são o *kraft* (85-90%) e “soda” (10-15%) (Clayton *et al.*, 1989; Biermann, 1996; Neto e Evtyuguin, 2004; Hon, 2007). Simplificadamente, no processo *kraft* a madeira é tratada a 140-170 °C, com soluções aquosas de NaOH e Na<sub>2</sub>S e a um pH situado no intervalo entre 12 e 14. No processo ao sulfito ácido, a deslenhificação ocorre sob temperaturas entre 130 e 170 °C, em soluções de sulfito/bissulfito de sódio, cálcio, magnésio ou amónio, a pH entre 1 e 5 (Neto e Evtyuguin, 2004).

### 1.2.2. Processo Kraft

O cozimento *kraft* é caracterizado pela reacção de deslenhificação das aparas de madeira com solução aquosa hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na<sub>2</sub>S) num digestor na presença de um licor (licor negro). Os reagentes activos neste licor são os iões OH<sup>-</sup> e HS<sup>-</sup> que são determinados através das seguintes reacções químicas (Clayton *et al.*, 1989):

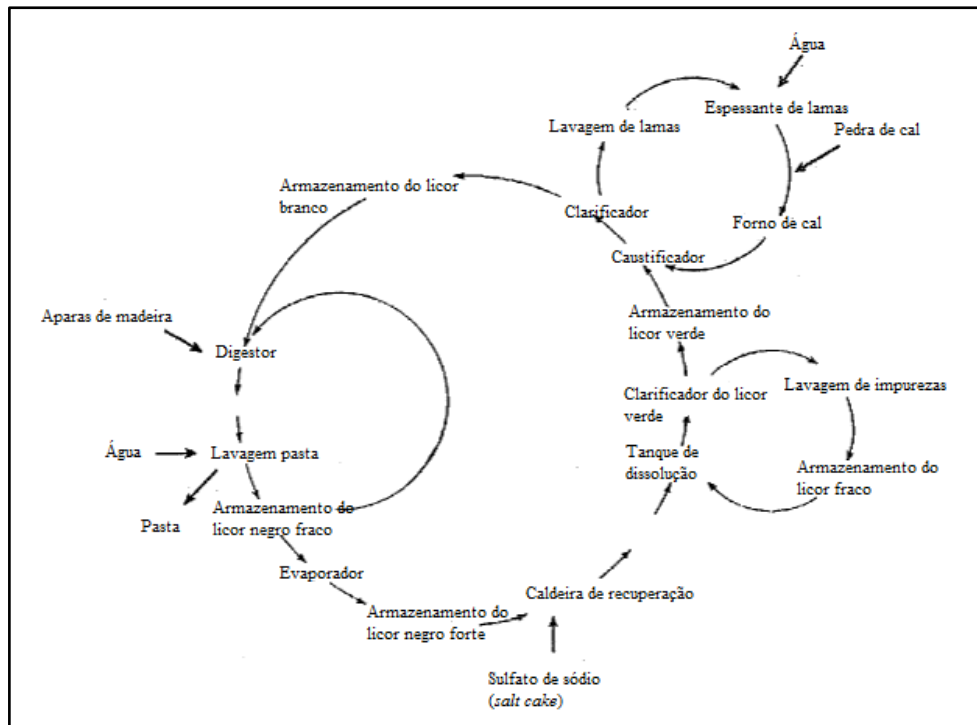


Pode ser um processo realizado de modo descontínuo ou contínuo. No processo descontínuo, as aparas são cozidas em digestores individuais onde o carregamento, o cozimento e a descarga são realizados em passos sequenciais (Biermann, 1996). O processo contínuo é utilizado com maior frequência na indústria, no qual as aparas são submetidas a um pré-tratamento com vapor para facilitar a impregnação e são introduzidas no digestor juntamente com o licor negro ou branco (ou uma mistura de ambos), onde são sujeita a um pH superior a 12 (Biermann, 1996), por um período de 1-2 horas, a elevadas temperaturas compreendidas entre 140-170°C e a pressões no intervalo de 7-12 bar (Carvalho,1999; Hon, 2007). Este processo resulta na obtenção de uma pasta crua acastanhada, devido à presença de grupos cromóforos e de lenhina residual (Mimms,1993), com elevada resistência fibrilar, altamente empregue numa ampla gama de produtos papaleiros. A pasta crua entretanto formada é sujeita ao processo de lavagem e crivagem, com a finalidade de se isolarem os incozidos e os nós, e posteriormente conduzida para a etapa de branqueamento. As substâncias isoladas são novamente introduzidas no digestor, dando continuidade ao cozimento (Carvalho,1999; Fengel,1989).

Finalizado o processo de cozimento, obtém-se um líquido rico em lenhina residual, componentes inorgânicos e outras substâncias resultantes da degradação e solubilização dos componentes da madeira, que originará um efluente designado por licor negro que pode ser valorizado para a produção de energia. Numa etapa posterior, o licor negro é concentrado numa unidade de evaporação, para depois ser queimado, maximizando assim a recuperação de calor (Biermann, 1996; Carvalho, 1999). Após a combustão do licor negro, recupera-se uma mistura inorgânica de  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e impurezas (*drags*) que, ao ser dissolvida em água, origina o licor verde. Este, após posterior processamento, converte-se em licor branco (Biermann, 1996).

As aparas de madeira são impregnadas com licor negro antes de entrarem no digestor. Este licor negro é reaproveitado de uma etapa posterior do processo. Tanto se pode usar o licor negro ou o branco ou uma mistura de ambos para a impregnação. No entanto, actualmente é mais frequente se utilizar o licor negro, pois não é tão alcalino quanto o branco (branco – lixívia – pH superior a 13; negro – pH inferior a 12), sendo facilitada a penetração dos sulfatos nas fibras, promovendo a sua desintegração.





**Figura 1.6:** Natureza cíclica do processo de cozimento *kraft* (adaptado Smook, 2002).

### 1.2.3. Comportamento dos componentes macromoleculares de *E. globulus* no cozimento *kraft*

A deslenhificação da madeira *kraft* de *E. globulus*, é geralmente dividida em três fases cinéticas distintas e consecutivas: a fase inicial, corresponde ao período de arranque no aquecimento do reactor, com uma lenta taxa de deslenhificação, onde ocorre cerca de 20-30% da deslenhificação, seguindo-se a fase principal, com uma taxa de remoção de lenhina mais acentuada, conduzindo a cerca de 90% de deslenhificação e, finalmente, a fase residual, onde se verifica um decréscimo da taxa de deslenhificação (Lisboa *et al.*, 2005). Com efeito, sob condições tão alcalinas, a lenhina é extensamente degradada e dissolvida (90-95% no fim do cozimento) no licor negro, libertando as fibras da madeira, compostas essencialmente por celulose e hemiceluloses (Pinto *et al.*, 2005a; Lisboa *et al.*, 2005).

A fase inicial da deslenhificação é a que revela menor selectividade, na qual os polissacarídeos (celulose, hemiceluloses e outros menos abundantes, como as pectinas) são

parcialmente degradados a outros derivados com menor peso molecular ou dissolvidos no licor negro (Lisboa *et al.*, 2005), sobretudo pela acção da hidrólise alcalina e pela  $\beta$ -eliminação sequencial do terminal redutor dos grupos terminais (reacção de *peeling*, Figura 1.7), afectando o desempenho do processo e qualidade das fibras (Pinto *et al.*, 2005a). Particularmente, a alcalinidade do meio pode provocar a ionização de parte dos grupos hidroxilo e conduzir à diacelilação das fracções acetil nas hemiceluloses (glucuronoxilanas), com o aumento da temperatura. Por outro lado, a celulose é mais resistente ao ataque alcalino e sofre menor degradação do que as hemiceluloses (Sixta, 2006). Nesta mesma fase, inicia-se a clivagem das ligações  $\beta$ -O-4 (Sixta, 2006), cujas unidades (S) e (G) são preferencialmente removidas, devido à ligação covalente que estabelecem com as xilanas, igualmente dissolvidas e degradadas (Pinto *et al.*, 2002).

Na fase principal, as reacções dos polissacarídeos são caracterizadas pela clivagem aleatória das ligações glicosídicas devido ao ataque alcalino (hidrólise alcalina), bem como pelas reacções de *stopping* (Figura 1.7), favorecidas a altas temperaturas (Sixta, 2006).

Nas fases principal e residual, a eliminação dos polissacarídeos é manifestamente menor, ainda que a hidrólise alcalina das ligações glicosídicas da fase residual, possa contribuir significativamente para o decréscimo do grau de polimerização dos polissacarídeos na pasta (Lisboa *et al.*, 2005). Também nesta fase final do processo ocorre a degradação da celulose com maior incidência (Sixta, 2006). Uma parte das unidades (S) é removida, promovendo a diminuição da razão S/G no licor negro (Pinto *et al.*, 2002), sendo que os monómeros da lenhina (S), (G) e (H) passam a corresponder a proporções de aproximadamente 60%, 30-40% e 5%, respectivamente (Pinto *et al.*, 2005b).

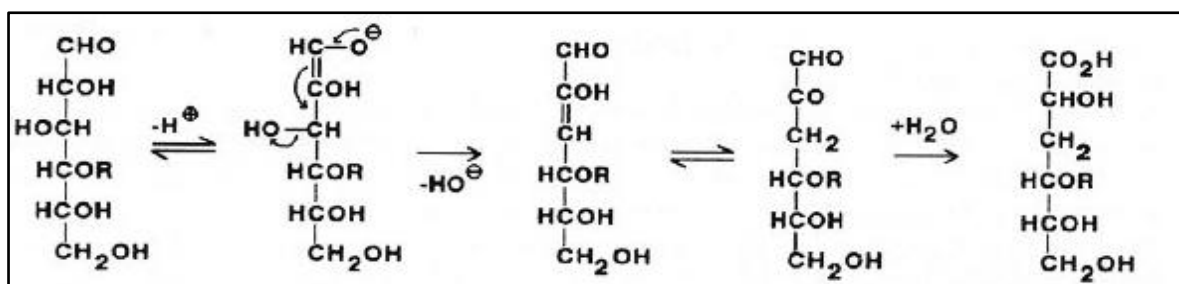


Figura 1.7: Representação esquemática do processo de bloqueio da reacção de *peeling* e de *stopping* (Sjöström, 1993).

#### 1.2.4. Branqueamento

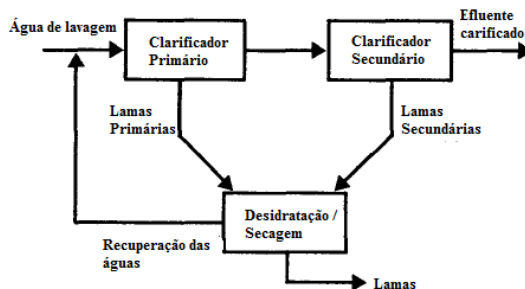
O branqueamento é um processo químico aplicado a pastas cruas para melhorar os níveis de brancura, através da eliminação da lenhina residual da pasta e da degradação de estruturas cromóforas (que absorvem a luz e apresentam cor), bem como remoção dos extractáveis, impurezas inorgânicas e resíduos da casca (Sjöström, 1993). O branqueamento pode ser alternativamente processado através da remoção da maior parte da lenhina (deslenhificação) ou apenas pela redução dos grupos cromóforos, sem remoção de lenhina. Da primeira alternativa obtêm-se pastas com elevado nível de brancura e frequentemente aplicadas em pastas químicas. A nível industrial realiza-se uma sequência com diversas etapas de branqueamento com recurso a químicos e extracção alcalina, com hidróxido de sódio. O branqueamento é conseguido por acção de agentes químicos fortemente oxidantes, como o oxigénio ( $O_2$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), hipoclorito de sódio ( $NaClO$ ), o dióxido de cloro ( $ClO_2$ ) que actua como um substituto do cloro ( $Cl_2$ ) menos nocivo e o ozono ( $O_3$ ), segundo uma variante denominada por ECF (*Elemental Chlorine free*). Por outro lado, através do processo que retém a lenhina, as pastas obtidas apresentam um nível moderado de brancura, frequentemente adequado para pastas semi-químicas, químico-mecânicas e mecânicas com elevados rendimentos. Esta variante é efectuada com recurso a peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), através de um processo designado por TCF (*Totally chlorine free*), onde não é utilizado qualquer tipo de oxidante que contenha cloro na sua composição (Sjöström, 1993; Smook, 2002).

No entanto, atendendo à finalidade de articular um custo mínimo de reagentes e equipamentos com a elevada brancura das pastas, normalmente utiliza-se uma combinação de reagentes em vários estágios.

### 1.3.Lamas Primárias

As fábricas de pasta e papel geram uma ampla gama de resíduos, que incluem na sua maioria resíduos florestais, resíduos provenientes do processo de caustificação e resultantes do transporte de materiais, da demolição e cinzas das caldeiras (Scott, 1995).

Os efluentes da produção de pasta são provenientes, na sua maioria, da recuperação dos filtrados da lavagem da pasta com elevada carga orgânica, em todas as fases do processo de cozimento, branqueamento e filtrados de máquinas da pasta e de máquinas de papel em fábricas integradas. Esses efluentes são submetidos a um tratamento que engloba duas etapas. Do tratamento primário obtêm-se, a partir do clarificador, as lamas primárias que resultaram do processo de sedimentação, onde a água é bombeada para tanques onde se removem os sólidos depositados. Estas lamas caracterizam-se por serem ricas em celulose e hemicelulose, embora apresentem sólidos inorgânicos em suspensão, originários tanto da área de recuperação como da produção de papel (carbonatos). Na segunda etapa, a água resultante do processo anterior é direccionada para um clarificador secundário, que por acção biológica, promove a assimilação de efluentes. Os sólidos obtidos sofrem nova clarificação primária, pelo que se misturam as lamas secundárias com as primárias, sendo posteriormente desidratadas e armazenadas (Graça, 2010; Scott, 1995).



**Figura 1.8:** Esquema de tratamento de efluentes líquidos (adaptado Scott, 1995).

As lamas celulósicas caracterizam-se quimicamente pelo seu teor de sólidos, pH, teor de cinzas, presença de hemiceluloses e celulose, pelo teor de lenhina (solúvel e insolúvel) e compostos extractáveis. Estudos revelaram que as lamas primárias possuem entre 40-50% de glucose e 50-75% de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose), em teor de massa seca (Kerstetter et al., 1997).

Quando comparada com pastas cruas de *Eucalyptus globulus*, as lamas primárias apresentam uma constituição morfológicamente idêntica ao nível das fibras celulósicas, assim como relativamente a análise de dados biométricos. No entanto, diferem no comprimento das fibras que é superior. As lamas evidenciam carácter hidrofóbico, que as demarcam de resultados obtidos para outras pastas. Relativamente ao nível de cristalinidade assim como o grau de polimerização nas fibras celulósicas das lamas, são bastante semelhantes aos das pastas, assegurando a qualidade estrutural das fibras celulósicas. Contudo, as lamas registam um teor de lenhina superior, que dificulta a reactividade da celulose e que pode ser justificado pelo facto de resultarem do tratamento de primário de efluentes líquidos de fábricas integradas. (Sequeira, 2005)

O elevado teor em matéria inorgânica contribui para uma diminuição da proporção de compostos fibrosos nas lamas, impedindo uma potencial valorização económica. A respectiva viabilidade da mesma, pode ser determinada pela conversão de polissacarídeos em monossacarídeos fermentáveis, após hidrólise química ou hidrólise enzimática. Para a hidrólise química é necessário um consumo elevado de reagente, além de todo o processo ser conotado com um nocivo impacto ambiental, na medida em que há libertação considerável de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A hidrólise enzimática surge como uma alternativa mais sustentável e promissora, embora requerendo razoabilidade na sua aplicação, atendendo ao elevado custo dos sistemas enzimáticos (Graça, 2010; Scott., 1995).

Os principais métodos utilizados para o processamento de lamas consistem na realização de operações de: (1) Espessamento e/ou concentração; (2) Estabilização; (3) Desidratação; (4) Secagem; (5) Incineração (Straub, 1989; Baruth, 2005). Contudo, a solução mais frequentemente adoptada no tratamento das lamas consiste no tratamento tradicional de fim de linha de produção, a deposição directa em aterro sanitário, após estabilização química e desidratação.

O processo de incineração das lamas para valorização energética assume a relevância maior como alternativa ao método de deposição. As quantidades de carbonato de cálcio remanescentes da linha de produção da pasta e papel podem ser recuperadas sob a forma

de óxido de cálcio, que poderá ser integrado novamente na linha de produção. Com o recurso à incineração, o volume de material que necessita de deposição em aterro (as cinzas) é fortemente diminuído e recupera-se alguma energia a partir das lamas. No entanto, o investimento de capital necessário e os padrões de controlo de poluição vigentes representam um forte entrave a esta alternativa ( Baruth, 2005; Scott, 1995).

A aplicação de lamas em materiais de construção, tais como no cimento, asfalto, em agregados e compósitos e a sua inclusão em fertilizantes e em aplicações para caixas e embalagens com fins não-alimentares, são opções também válidas (Scott, 1995)

As lamas de pasta e papel disponibilizam diversas vantagens na tecnologia de conversão de etanol. Primeiramente, as lamas apresentam custos muito reduzidos, quando comparadas com a produção de biomassa como fonte de energia. Em segundo, os sólidos obtidos a partir do clarificador primário sofreram um extenso tratamento mecânico e químico. Segundo estudos desenvolvidos, somente algumas lamas necessitam de um reduzido pré-tratamento para atingir elevados rendimentos ao nível da hidrólise, nomeadamente através da hidrólise enzimática, usando enzimas de celulase. Em terceiro lugar, a hidrólise é processada em suspensão, não se acrescentando nos custos, frequentemente em operações de drenagem de polímeros. Finalmente, em associação com a fábrica de celulose, podem reduzir-se os custos de produção através do fornecimento de equipamentos de manuseamento de materiais, suprimentos de vapor e sistemas de tratamento de águas residuais. Combinando todas estas vantagens, é possível reduzir significativamente o capital e custos de operação, quando comparado com o processo de conversão de madeira em etanol (Kerstetter *et al.*, 1997).

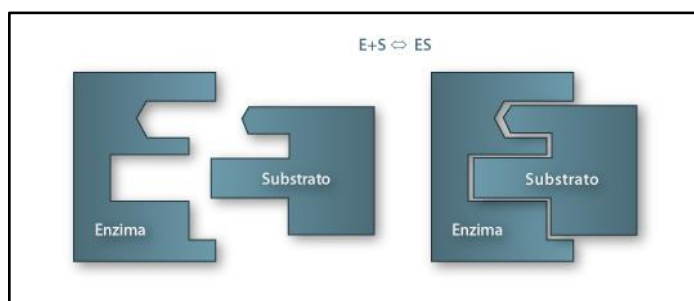
#### **1.4.Enzimas**

As enzimas são catalisadores biológicos, responsáveis pela elevada velocidade de complexas reacções químicas, das quais dependem a existência de células e microrganismos. Estas reacções ocorrem sem o consumo da própria enzima, sendo que

estas não assumem o papel de reagentes ou produtos, conservando-se o equilíbrio reaccional. As enzimas são altamente selectivas, catalisando uma determinada reacção, a temperaturas relativamente baixas, de um determinado substrato (Aires-Barros *et al.*, 2003; Guibault, 1973).

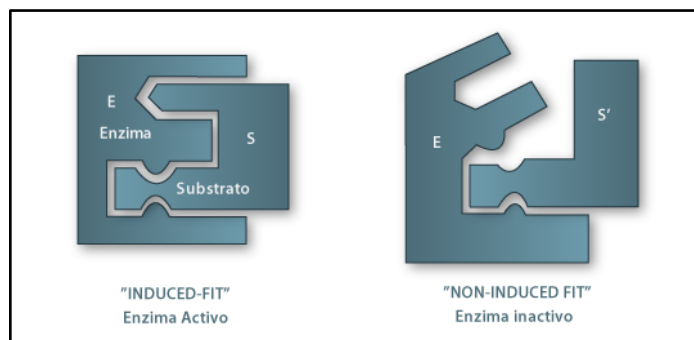
As enzimas são de natureza proteica, constituídas por longas cadeias de aminoácidos conectados por ligações peptídicas, entre o grupo  $\alpha$ -amino de um aminoácido e o grupo  $\alpha$ -carboxílico do aminoácido adjacente. Apresentam uma estrutura tridimensional devida ao enovelamento das cadeias peptídicas, favorecendo uma proximidade ao centro activo por parte dos aminoácidos situados em regiões mais distantes da sequência primária.

Cada tipo de enzima dispõe de um local específico na sua superfície, denominado por centro activo, que é uma pequena fenda onde o substrato se liga e onde ocorre a catálise. O substrato liga-se ao centro activo por ligações não-covalentes (interacções electrostáticas, pontes de hidrogénio, interacções de *van der Waals* e interacções hidrofóbicas). A especificidade da ligação enzima-substrato depende de como os átomos se posicionam, de uma forma definida, no centro activo. A elevada especificidade das enzimas pode ser atribuída à sua estrutura tridimensional que permite um perfeito encaixe com o substrato. Esta especificidade tão demarcada para o substrato e produto, consequentemente promove a frequente ausência de produtos secundários no decurso das reacções enzimáticas (Aires-Barros *et al.*, 2003; Motta, 2003). Dois modelos foram propostos para explicar a especificidade enzimática: o modelo da chave-e-fechadura (Figura 1.9), desenvolvido por *Fisher* em 1890, em que a fenda do centro activo e o substrato são complementares; o modelo do encaixe-induzido (Figura 1.10), desenvolvido por *Koshland Jr.* 1968, afirma que a proteína é mais flexível e adapta-se ao substrato (Motta, 2003).



**Figura 1.9:** Representação do modelo chave-fechadura (Disponível em:

[http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=96&Itemid=201#5](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=96&Itemid=201#5)).



**Figura 1.10:** Representação do modelo do encaixe-induzido (*Disponível em: [http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=96&Itemid=201#5](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=96&Itemid=201#5)*).

### 1.4.1. Classificação Enzimática

Atendendo à necessidade de se definir de forma precisa a vasta gama de enzimas existentes que participam nos diversos processos, bem como de se adoptar de um sistema que promova a exequibilidade da identificação dos seus nomes, a Comissão para Enzimas da União Internacional de Bioquímica (IUB) em 1961 propôs uma nomenclatura trivial e sistemática. Com efeito, cada enzima é classificada de acordo com o tipo de reacção que catalisa, agrupada em seis categorias enzimáticas (1.Oxidoredutases, 2.Transferases, 3.Hidrolases, 4.Liasas, 5.Isomerases e 6.Ligasas) e outras sub-categorias. É atribuído um número de código com quatro elementos a cada enzima, cujos dígitos referem-se à classe, subclasse, subsubclasse e ordenamento das enzimas no seio de cada categoria, respectivamente. À classificação trivial acima referida, é acrescentada a designação sistemática, que aglutina o sufixo “ase” (que traduz a natureza da reacção) ao nome sistemático que abrange também o nome do substrato (Aires-Barros *et al.*, 2003). Por exemplo, a enzima endocelulase com o número de código EC 3.2.1.4, cujos números referem-se à classe das hidrolases, subclasse das hidrolases que actuam na quebra de ligações glicosídicas, subsubclasse das hidrolases que actuam na quebra de ligações glicosídicas e número de ordem da enzima, respectivamente.



### 1.4.2. Actividade Enzimática

A actividade enzimática traduz a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por unidade de tempo a 25°C, ajustando concomitantemente, as condições óptimas de pH. Portanto, pode ser expressa em U, unidades de actividade enzimática (Aires-Barros *et al.*, 2003).

Existe um conjunto de factores que se assumem preponderantes na actividade enzimática, influenciando a extensão da reacção, nomeadamente as concentrações de enzima e substrato, a temperatura e o pH, bem como os activadores, inibidores e força iónica (Guibault, 1973). Estas condições devem permanecer constantes, tanto quanto possível, durante os períodos de tempo estipulados para a monitorização de uma medição, por forma a não ser passível de afectação (Taylor, 2004).

### 1.4.3. Cinética Enzimática

A cinética enzimática traduz o estudo quantitativo da catálise através de enzimas, nomeadamente acerca do mecanismo de acção catalítica, da especificidade das enzimas, e sobre alguns factores que influenciam a velocidade das reacções e a quantificação dos seus efeitos. Apesar de catalisarem uma vasta gama de reacções por diferentes mecanismos, as enzimas podem ser analisadas quanto às suas velocidades para que as suas eficiências sejam quantificadas (Motta., 2003).

De acordo com o modelo proposto por Michaelis-Menten, o mecanismo para a reacção da enzima, E, com o seu substrato, S, traduz-se pela combinação entre ambos no centro activo da enzima, formando um complexo intermediário, ES, que se divide dando origem aos produtos, P, e libertando a enzima. A formação do complexo intermediário ocorre segundo um processo rápido e reversível, onde  $k_1$  e  $k_2$  são as constantes de velocidade para formação do complexo ES e para a dissociação do mesmo, respectivamente. A constante de velocidade,  $k_3$ , é responsável pela formação do produto e libertação do centro activo (Guibault, 1973).



A constante de equilíbrio da reacção de formação do complexo ES,  $K_m$ , também denominada por constante de Michaelis, é definida como,

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1 \quad [5]$$

A velocidade inicial da reacção é então dada como função da concentração da enzima e do substrato,

$$V_0 = V_{max}[S]_0 / (K_m + [S]_0) \quad [6]$$

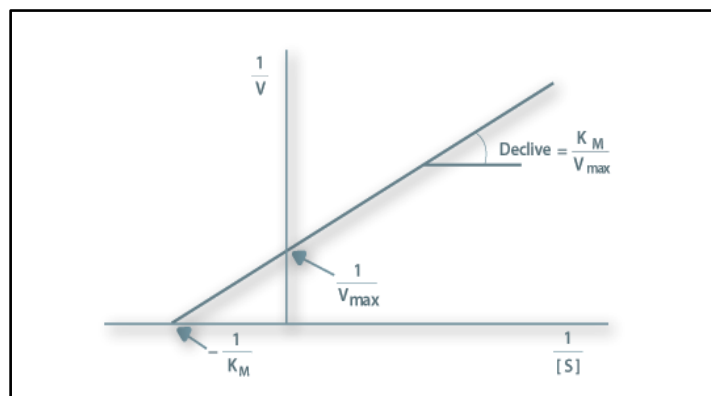
onde  $[S]_0$  é a concentração inicial de substrato e  $V_{max}$  é a velocidade máxima de reacção, atingida sob condições de saturação da enzima em condições específicas (temperatura, pH e força iónica).

Pela Equação 6, a velocidade de reacção aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de substrato, para uma concentração fixa da enzima. Quando o limite de excesso de substrato é atingido (concentração máxima de substrato que a enzima pode admitir), a velocidade da reacção catalisada adopta um comportamento aproximadamente constante, mesmo com a adição de mais substrato. (Figura 1.11)

Assim, quando  $V = V_{max}/2$  e rearranjando a Equação 6, obtém-se  $[S] = K_m$ . O valor de  $K_m$  é numericamente igual à concentração de substrato, na qual a velocidade inicial de reacção corresponde a metade da velocidade máxima.

O valor de  $K_m$  é um bom indicador quantitativo da reacção enzimática, podendo ser determinado através do declive da dependência,  $1/V_0 = f(1/[S])$ , do método de *Lineweaver-Burk*,

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad [7]$$



**Figura 1.11:** Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk (*Disponível em:* [http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=96&Itemid=201#5](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=96&Itemid=201#5)).

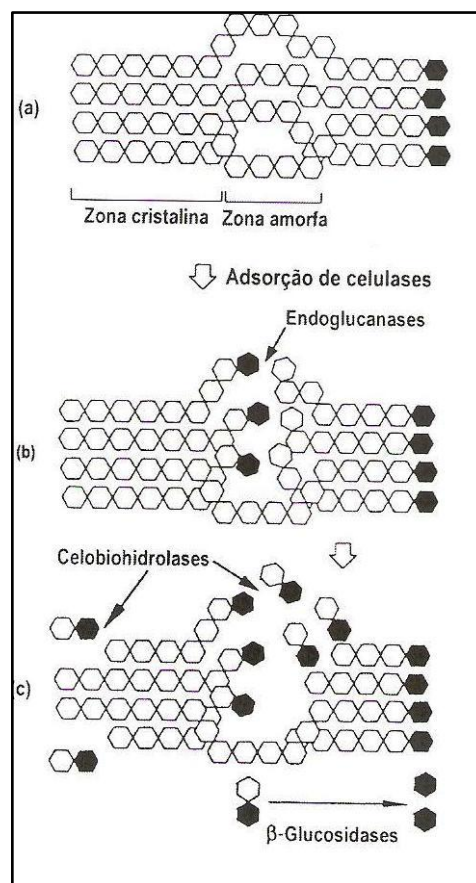
Quanto menor for o valor de  $K_m$ , mais completa será a reacção enzima-substrato, uma vez que reflecte maior afinidade da enzima pelo substrato. Portanto, a eficiência catalítica máxima é alcançada a baixas concentrações de substrato. (Guibault, 1973)

#### 1.4.4. Celulase

A degradação da cadeia polimérica da celulose requer a presença de enzimas que pertençam à classe das hidrolases, portanto enzimas hidrolíticas, nomeadamente a celulase. Existem vários tipos de enzimas hidrolíticas, designadas de forma genérica por endoglucanase, exoglucanase (ou celobiohidrolase) e  $\beta$ -glucosidase, que podem actuar sinergicamente, dependendo da natureza do substrato, da dosagem e da razão de concentração entre elas (Béguin e Aubert, 1994; Henrissat, 1994).

As referidas enzimas hidrolíticas apresentam especificidade para hidrolisar as ligações  $\beta(1 \rightarrow 4)$  entre duas unidades de anidroglicose, ainda que se distingam no modo de acção sobre a celulose, presumivelmente devido a arranjos estruturais diferentes. Portanto, as celulasas podem ser classificadas da seguinte forma (Figura 1.12):

As endoglucanase (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase), participam na degradação da celulose amorfa, atacam aleatoriamente as ligações glicosídicas no interior da cadeia celulósica e elevam o número de lugares livres para a intervenção das exoglucanase; conduzem a uma despolimerização rápida do substrato e o principal produto é a celobiose. As exoglucanase degradam eficazmente as regiões cristalinas da celulose, a partir da clivagem de dímeros de celobiose nas extremidades, redutora ou não-redutora, da cadeia celulósica; estão associadas a uma lenta despolimerização do substrato. As  $\beta$ -glucosidase convertem a celobiose em glucose, minimizando assim a acção inibitória que a celobiose exerce sobre a actividade das outras celulases (Béguin e Aubert, 1994; Henrissat, 1994).



**Figura 1.12:** Mecanismo de degradação enzimático-acção sinérgica entre endo- e exo-glucanases (Béguin e Aubert, 1994).

## 1.5.Processamento Hiperbárico

A tecnologia por alta pressão tem vindo a ser empregue nas recentes décadas, motivado por um aumento de aplicações em várias áreas da química, nomeadamente em química orgânica sintética. Com esta tecnologia, as reacções orgânicas em que os reagentes e/ou produtos são sensíveis ao calor e/ou não reagem à pressão atmosférica podem ser realizadas em condições ligeiras, permitindo uma melhor conservação da qualidade dos produtos. A alta pressão é um modo de activação físico não-destrutivo para as reacções orgânicas e é uma ferramenta útil para a química orgânica ecológica, devido à poupança de energia associada e por conseguir melhorar significativamente tanto a selectividade como o

rendimento das reacções, ou seja, a estereosseletividade, regioselectividade e a quimiosseletividade, evitando a produção de resíduos e a utilização de catalisadores metálicos e as altas temperaturas (Minuti, 2009).

A tecnologia de alta pressão tem sido largamente proveitosa e em franca expansão no sector industrial alimentar, atendendo ao crescente nível de qualidade exigencial dos consumidores, na aquisição de alimentos com o mínimo de processamento e com a preservação das propriedades organolépticas (Rahman, 1998). Com o recurso a esta inovadora tecnologia, é possível através da modificação das propriedades macromoleculares e da influência nos processos fisiológicos (Ferreira *et al.*, 2011), obter um produto final processado livre de aditivos, de aparência natural e qualidade elevada, que permaneçam asseguradas durante o seu armazenamento (Rahman, 1998), oferecendo melhores vantagens do que o processamento térmico (Figueiredo *et al.*, 2010).

O tratamento a pressões elevadas causa a destruição de microrganismos, devido à ruptura da sua membrana celular. Na aplicação em sistemas enzimáticos, a alta pressão provoca a desnaturação da estrutura das enzimas, enquanto deixam intactas moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem sabor aos alimentos. Com efeito, a tecnologia de alta pressão tem a vantagem de causar a degradação mínima do sabor e de nutrientes quando comparada à pasteurização térmica tradicional, que agrava as características nutricionais e sensoriais, devido à influência sobre as ligações covalentes e não-covalentes (Aires-Barros *et al.*, 2003).

Outra área de desenvolvimento mais recente incide sobre a indústria agroflorestal, centra-se no tratamento hiperbárico da pasta de celulose, que surge como um importante instrumento para a alteração não-degradativa das propriedades das fibrilas de celulose (Figueiredo *et al.*, 2011).

Diversos estudos e técnicas de pré-tratamento foram desenvolvidos, motivados pelo objectivo de se produzir, de forma viável, opções renováveis para a produção de químicos e combustíveis de segunda geração (Figueiredo *et al.*, 2011).

Actualmente, esta técnica é frequentemente empregue no laboratório e na indústria, mesmo porque um ligeiro aumento de pressão implica efeitos significativos nas reacções em solução. Aplicando alta pressão, as reacções químicas com um volume de activação negativo são activadas. A maioria das reacções orgânicas tem um volume de activação negativo e, portanto, são influenciáveis pela pressão elevada, dependendo do volume de activação (Minuti, 2009).

O termo “alta pressão” indica uma gama desde 100-900 MPa. O equilíbrio termodinâmico que descreve uma reacção submetida a pressão, é determinado pela variação do seu volume. A relação entre a pressão (P) e a constante de reacção (k) é expressa por,

$$\frac{\delta \ln k}{\delta P} = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad [8]$$

onde  $\Delta V^\ddagger$  representa o volume de activação, definido como a diferença entre o volume ocupado pelo estado de transição e o volume ocupado pelos reagentes. Se  $\Delta V^\ddagger$  é negativo, a constante de reacção aumenta com o aumento da pressão. Da mesma forma, o efeito da pressão no equilíbrio da reacção,

$$\frac{\delta \ln K}{\delta P} = - \frac{\Delta V}{RT} \quad [9]$$

onde  $\Delta V$  é o volume molar e K a constante de equilíbrio (Minuti, 2009).

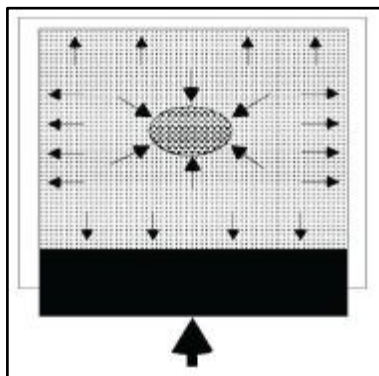
### 1.5.1. Princípio de Funcionamento

O tratamento por altas pressões hidrostáticas emprega a água como o principal fluido de compressão, actuando como canal de transferência de pressão e funcionando segundo os princípios de Le Chatelier e Isostático.

Pelo princípio de Le Chatelier, qualquer reacção, alteração conformacional ou alteração de fase, que seja acompanhada por uma redução de volume será sempre favorecida pela pressão. No caso de se verificar um aumento de volume, a reacção é retardada ou inibida (Akyol, 2004; Campos, 2003).

O princípio de compressão Isostática revela que a pressão é exercida em todas as direcções e de forma homogénea, independentemente do volume, tamanho e geometria da amostra. Portanto, a substância em análise é submetida a uma compressão e quando a pressão é aliviada, adquire o seu formato original (Akyol, 2004; Guerrero-Beltran *et al.*, 2005).

A pressão aplicada e o tempo de pressurização dependem do tipo do produto a ser tratado e do produto final desejado (Campos, 2003).



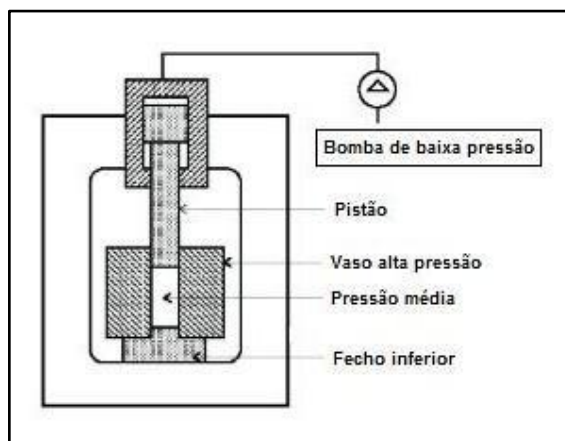
**Figura 1. 13:** Representação esquemática do princípio de compressão isostática (Ohlsson, 1995)

### 1.5.2. Equipamento

O equipamento comercial de alta pressão é constituído por um vaso resistente à alta pressão, uma bomba de compressão do líquido que actua como gerador de pressão, o próprio circuito de pressão; um sistema responsável pela monitorização e controlo da pressão (e da temperatura) e uma unidade de manuseamento do produto, para transferir o produto de e para o recipiente de pressurização (Guerrero-Beltran *et al.*, 2005).

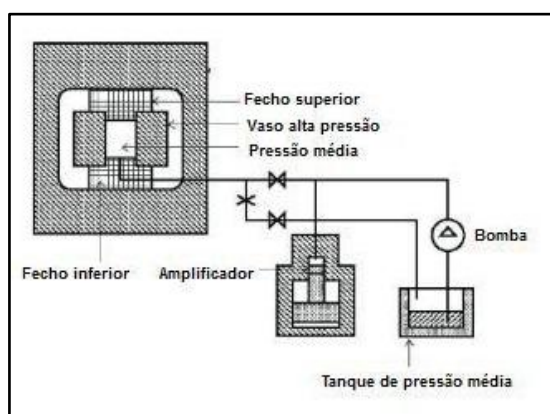
As principais etapas do processo correspondem ao adequado embalamento da amostra e à introdução da mesma no vaso, à injeção de um fluido de transmissão de pressão, à erradicação do ar presente no vaso, rematada pela etapa de pressurização do mesmo.

A geração de pressão dentro do vaso pode ser alcançada por compressão directa ou indirecta, ou ainda por aquecimento do meio de pressão. Na compressão directa (Figura 1.14), ocorre a redução da câmara de tratamento por acção de uma pressão hidráulica aplicada sobre um pistão, no interior do vaso. Este método é executado à escala laboratorial ou em sistemas de planta piloto (Njoroge, 2011; Rahman, 1998).



**Figura 1. 14:** Representação esquemática do modo de geração de alta pressão por compressão directa. (Njoroge, 2011)

A compressão indirecta (Figura 1.15) envolve o uso de um intensificador ou amplificador de alta pressão, que bombeia o fluido de pressurização directamente para o interior do vaso, para atingir uma dada pressão (Njoroge, 2011).



**Figura 1. 15:** Representação esquemática do modo de geração de alta pressão por compressão indirecta. (Njoroge, 2011)

No aquecimento por meio de pressão o fluido de pressurização sofre uma expansão motivada pelo aumento de temperatura que, por consequência, gera um aumento da



pressão. Esta aplicação combinada requer um controlo muito preciso da temperatura dentro de todo o volume interno do vaso de pressurização (Njoroge, 2011).

Os factores críticos do processo hiperbárico incluem a pressão, o tempo de pressurização, o tempo para atingir a pressão do tratamento, o tempo de descompressão, a temperatura do tratamento (incluindo aquecimento adiabático), a temperatura inicial da amostra, a distribuição da temperatura no vaso de pressão, o pH da amostra, a composição da amostra, a actividade de água da amostra, a integridade do material de embalagem e adicionais processamentos concorrentes (Brennan, 2006).

### **1.5.3. Efeito do Tratamento Hiperbárico**

A celulose é um polímero com características amorfas e cristalinas, facto que representa dificuldade acrescida para a ocorrência de hidrólise ao nível da acessibilidade aos domínios cristalinos (Figueiredo *et al.*, 2010). Os resultados obtidos para estudos em pastas de *Eucalyptus globulus* revelaram que a pressão elevada promove o rearranjo estrutural nas fibrilas da celulose, levando à junção dos cristalitos de celulose com os planos adjacentes devidamente orientados, cujas superfícies são suficientemente próximas. O rearranjo das fibrilas submetidas a alta pressão pode causar um aprisionamento de moléculas de água nas cavidades internas dos agregados fibrilares ou entre as superfícies das fibrilas, permitindo assim a penetração profunda da água, o aumento do nível de hidratação das fibras e o afastamento destas (Ferreira *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2010).

A partir de estudos recentes, no âmbito da aplicação de alta pressão como auxílio no desempenho enzimático sobre pastas *kraft* (Ferreira *et al.*, 2011; Oliveira *et.al.*, 2011), demonstra-se que este tratamento promove um melhor acesso da enzima na quebra das ligações glicosídicas, durante toda a reacção de hidrólise e em particular na fase inicial. Assim o efeito hiperbárico é mais notório quanto menor for o tempo de hidrólise. O acesso facilitado da enzima na celulose é indicativo de que a enzima tem acesso às ligações glicosídicas que não são acessíveis em pastas não-tratadas, permitindo uma maior extensão da hidrólise. Assim, o tratamento hiperbárico favorece uma hidrólise mais uniforme das

fibras celulósicas, devido à melhor acessibilidade tanto às zonas amorfas como às cristalinas (Ferreira *et al.*, 2011).

O tratamento hiperbárico, contrariamente ao pressuposto, demonstrou um carácter endotérmico, atendendo ao abaixamento da temperatura registado em ~10 °C, em pastas de *E. globulus*. Parte-se do pressuposto que dever-se-á à quebra das ligações por pontes de hidrogénio entre as superfícies de celulose inacessíveis, uma vez que a entalpia livre de hidratação é inferior à entalpia de ligação intermolecular. Como tal, o tratamento a elevada pressão tem que forçosamente disponibilizar superfícies da celulose que antes se mantinham inatingíveis (Figueiredo *et al.*, 2010). As especificidades da hidrólise enzimática podem ser controladas através da selecção adequada das condições do tratamento por alta pressão (Ferreira *et al.*, 2011).

Os tratamentos hiperbáricos são amplamente promissores, uma vez que promovem a facilidade e extensão da hidrólise enzimática da celulose, produzindo açúcares para a produção de produtos químicos e bioetanol de segunda geração (Ferreira *et al.*, 2011). No entanto, implicam uma tecnologia que ainda acarreta custos elevados, principalmente devido ao dispendioso capital inicial, o que ainda limita a sua aplicação a produtos de alto valor acrescentado. Contudo, através do desenvolvimento tecnológico é previsível que estes custos se tornem mais acessíveis (Campos, 2003).

## **Capítulo 2 – Metodologia Experimental**

Neste capítulo pretende-se avaliar o efeito de um pré-tratamento por alta pressão (400 e 500 MPa) sobre o desempenho dos tratamentos ácido e enzimático, de forma individual e combinada, nas lamas primárias cedidas pela fábrica integrada da Portucel de Setúbal. A metodologia de estudo envolve três etapas, em que a primeira corresponde à caracterização global da matéria-prima. A segunda etapa é de avaliação prévia de diversas sequências de tratamento, nomeadamente o pré-tratamento de neutralização das lamas com ácido sulfúrico, o tratamento com lavagem ácida de ácido clorídrico e o tratamento hiperbárico, com o intuito de inferir acerca da real influência do mesmo na hidrólise enzimática das lamas primárias. A última etapa abrange a optimização das condições do tratamento hiperbárico, com a finalidade de melhorar o processo de hidrólise enzimática das lamas, atendendo à maior ou menor quantificação de açúcares redutores formados.

## **2.1.Caracterização Química das Lamas Primárias**

A caracterização química das lamas primárias foi realizada segundo as normas aplicáveis ou segundo as referências bibliográficas indicadas em cada caso. Para a execução da caracterização, foram aplicadas as seguintes técnicas de avaliação: determinação do teor de humidade na amostra em base seca, determinação do teor de cinzas, determinação do teor de carbonatos, digestão das lamas e classificação da presença de metais, quantificação de extractáveis. Para todas as técnicas de caracterização foram realizados ensaios em duplicado.

Para efeito de simplificação na designação da amostra, denominam-se por “lamas primárias iniciais” ou “LP inicial”, a matéria-prima recebida sem qualquer tipo de pré-tratamento.

### **2.1.1. Humidade**

O teor de humidade foi determinado segundo a Norma Internacional ISO 638 1978 e EN 20 638. O método baseia-se no registo da variação gravimétrica de uma amostra,

inicialmente com  $10 \pm 0.0001\text{g}$ , antes e após secagem numa estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , com pelo menos um dia de intervalo. A amostra é pesada num copo previamente seco na estufa e arrefecido no exsiccador. O teor da humidade (W) foi calculado através da Equação 10.

$$W (\%) = 1 - \frac{\text{massa da amostra após secagem}}{\text{massa da amostra antes da secagem}} \times 100 \quad [10]$$

### 2.1.2. Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado através da pesagem de  $15\text{g} \pm 0.0001\text{g}$  de amostra em cadinhos cerâmicos, previamente calcinados na mufla (Figura 2.1) a  $900^\circ\text{C}$  durante 2h30min. Os cadinhos calcinados são arrefecidos num exsiccador durante 30 min e depois são pesados sem e com amostra. Levam-se então os cadinhos à mufla, inicialmente à temperatura fria, até aos  $525^\circ\text{C}$ , por um período de 4h. Deixam-se os cadinhos e o conteúdo arrefecer num exsiccador, durante pelo menos por 30min e procede-se à pesagem dos mesmos. (NP 3192) O teor de cinzas (Z) foi calculado através da Equação 11.

$$Z (\%) = \frac{\text{massa de cinzas}}{\text{massa de amostra seca}} \times 100 \quad [11]$$



**Figura 2. 1:** Representação da mufla de aquecimento.

### 2.1.3. Teor de Carbonatos

O teor de carbonatos foi determinado, utilizando os cadinhos (com as respectivas amostras) referentes ao ensaio do teor de cinzas. Estes cadinhos foram novamente submetidos à incineração na mufla a 900°C, por um período nunca inferior a 4 horas, seguido da remoção dos mesmos e de arrefecimento à temperatura ambiente num exsiccador. O ensaio termina com a pesagem das amostras após calcinação e o teor de carbonatos é calculado através da Equação 12 e segundo a norma NP ISO 2144.

$$X = \frac{\text{massa cadinho}_{\text{carbonatos a } 900^{\circ}\text{C}} - \text{massa cadinho}}{\text{massa}_{\text{amostra inicial seca}}} \times 100\% \quad [12]$$

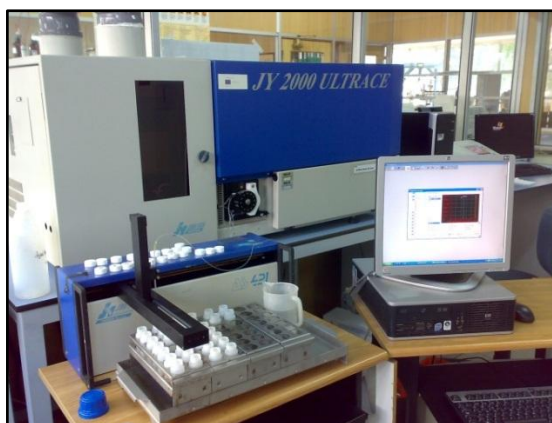
### 2.1.4. Análise de Metais

O ensaio aos metais é realizado, procedendo-se a uma parte que engloba a digestão das lamas e, posteriormente, a outra parte definida pela filtração do resíduo da digestão.

Pesam-se  $2,5\text{g} \pm 0.0001\text{g}$  de amostra em base seca para um copo. Preparam-se, para um total de 50mL/copo, uma solução de ácido nítrico e ácido clorídrico na proporção de 1:2, a adicionar a amostra. Coloca-se o copo na placa de aquecimento (Figura 2.2), a 250°C, até que o nível do conteúdo se reduza a uma medida aproximadamente igual a 10 mL. Regula-se a formação de espuma com pequenos esguichos de água para o interior do copo. Findada esta etapa, retira-se o copo da placa e deixa-se arrefecer durante aproximadamente 15 min. Seguidamente, procede-se à filtração dos cerca de 10 mL residuais para um balão volumétrico de 250 mL, auxiliada por pequenos volumes da água da lavagem do copo, até perfazer a marca. O conteúdo do balão é quantitativamente transferido para os recipientes adequados para a análise por espectroscopia de emissão atómica de acoplamento por plasma induzido, ICP-AES (Figura 2.3).



**Figura 2. 2:** Digestão das lamas iniciais, na placa de aquecimento.



**Figura 2. 3:** Representação do equipamento ICP-AES.

### 2.1.5. Análise de Extractáveis

A análise do teor de extractáveis foi realizada através da extracção, com acetona como solvente, durante 4 h num extractor de Soxhlet de 125 mL (Figura 2.4a). Para tal pesou-se  $10\text{g} \pm 0,0001\text{g}$  de amostra para um cartucho de extracção e, reservou-se o conteúdo, colocando no topo uma porção de papel de filtro. Adicionou-se cerca de medida e meia (do extractor) de acetona, aproximadamente 180 mL, completando-se a montagem experimental com o balão de fundo redondo de 500 mL em contacto com a manta de aquecimento. Após terminada a extracção, evaporou-se o extracto num evaporador rotativo (Figura 2.4b), com pequenos volumes transferidos do balão de 500 mL do extracto para um

balão de 100 mL (previamente pesado depois de ser levado à estufa) onde o extracto é concentrado.



**Figura 2. 4:** a) Representação da operação de extracção em acetona com extractor de Soxhlet de 125mL (esquerda); b) concentração do extracto no evaporador rotativo (direita).

Findada a evaporação, o balão de 100 mL é deixado a arrefecer no exsiccador e, posteriormente, é pesado com o resíduo. O teor de extractáveis é determinado de forma quantitativa, segundo a variação das pesagens, expressa na Equação 13.

$$\text{Ex}(\%) = \frac{\text{massa de extractáveis}}{\text{massa da amostra após secagem}} \times 100 \quad [13]$$

Entretanto, efectua-se uma lavagem com água aquecida (aproximadamente a 50°C) aos cartuchos de extracção remanescentes, com as lamas no seu interior. Para tal, prepara-se uma montagem para filtração a vácuo: sobre um kitasato coloca-se um funil de Büchner de dimensões largas com o papel de filtro; transfere-se para o seu interior, todo o conteúdo de ambos os cartuchos e procede-se à lavagem, com cerca de um litro de água, divididos em pequenos volumes. Executa-se o passo até não restarem vestígios de acetona. Por fim, transfere-se o conteúdo do filtrado para uma superfície e deixa-se repousar num local seco (Figura 2.5).





**Figura 2. 5:** Lamas iniciais secas ao ar, após extracção.

## **2.2.Caracterização LP neutralizadas com ácido sulfúrico**

De forma homóloga à caracterização física e química das lamas iniciais, realizaram-se também os ensaios de humidade das lamas pré-neutralizadas antes e após extracção, determinam-se os teores de cinzas e carbonatos, bem como a análise de extractáveis e dos metais, segundo as normas aplicáveis em cada caso e as respectivas metodologias. Além dos ensaios acima referidos, realizaram-se também os ensaios referentes à determinação do teor de lenhina insolúvel e solúvel (secção 2.2.1.) e análise de açúcares elementares (secção 2.2.2.). Todos os ensaios realizaram-se em duplicado.

### **2.2.1. Teor de Lenhina**

A determinação do teor de lenhina insolúvel realiza-se através de duas hidrólises sequenciais. Para tal, pesam-se  $2,0 \pm 0,0001$ g em base seca de lamas extraídas (resultantes da extracção com acetona) para copo de 100mL (previamente pesado). Seguidamente, prepara-se uma solução de 250 mL de ácido sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72% v/v), por diluição de outra solução de ácido sulfúrico (96%) e transfere-se para um recipiente de vidro adequado. Adicionam-se 40 mL da solução preparada (em pequenos volumes) ao copo de 100 mL com a amostra. Com uma vareta de extremidade achatada, envolve-se bem o conteúdo promovendo a sua mercerização ao máximo, para que a hidrólise seja facilitada.

Leva-se o copo com a amostra e o volume de ácido adicionado a um banho a 25°C, durante 1h30, onde ocorrerá a primeira hidrólise do ensaio (Figura 2.6a). Intervala-se este período de tempo com ligeira agitação do copo e reserva-se o mesmo com um vidro de relógio no topo.

Findada a primeira hidrólise, transfere-se o conteúdo do copo para um erlenmeyer de 2000 mL, previamente preenchido com 500 mL de água ultrapura, efectuando-se várias lavagens ao copo e vareta, recolhendo o máximo de amostra possível. Completa-se o restante volume com água ultrapura, perfazendo um volume total de 1500 mL de água adicionada, de forma a obter-se o ácido sulfúrico diluído a 3%. Marca-se o nível de água no erlenmeyer para que se possa manter o mesmo constante ao longo do ensaio. Submete-se o erlenmeyer ao aquecimento numa placa a mais de 100°C, até ferver, durante 4 horas, mantendo sempre o nível de solução constante com a adição sucessiva de volumes de água aquecida (Figura 2.6b). Após terminar a segunda hidrólise, deixa-se a repousar. Executa-se uma filtração a vácuo do conteúdo do erlenmeyer, com recurso a um cadinho de Göch, previamente submetido à estufa e pesado. Reserva-se o cadinho com o filtrado na estufa, de um dia para o outro e pesa-se no dia seguinte, determinando-se o teor de lenhina insolúvel através da Equação 14,

$$L_{\text{insolúvel}}(\%) = \frac{\text{massa de lenhina}}{\text{massa da amostra absolutamente seca}} \times 100 \quad [14]$$



**Figura 2. 6:** a) Representação do banho de aquecimento da primeira hidrólise ácida da lenhina (esquerda) e da b) segunda hidrólise ácida (direita).

O líquido sobrenadante, resultado da filtração a vácuo através dos cadinhos mais as águas de lavagem, é transferido para recipientes adequados de 250 mL. Procede-se então à análise da lenhina solúvel, através da medição da absorvância da amostra no espectro de absorção UV-VIS, a 205nm com percurso óptico de 10mm (Figura 2.7).



**Figura 2. 7:** Representação do espectrofotômetro de absorção UV-VIS.

A concentração de lenhina é calculada segundo a Equação 15, correspondente à absorvância medida e o teor de lenhina solúvel é determinado através da Equação 16,

$$C = \frac{\text{Absorvância medida}}{\epsilon b} \quad [15]$$

$$\text{Lenhina solúvel (\%)} = \frac{\text{Concentração de lenhina}}{\text{massa de lenhina absolutamente seca}} \times 100 \quad [16]$$

### 2.2.2. Análise de Açúcares Neutros

A análise de açúcares neutros consiste num conjunto de etapas iniciada pela hidrólise ácida onde se obtêm os açúcares em solução, seguida pela redução aos açúcares, pela acetilação dos alditóis e culmina na análise por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, GC-FID.

Pesam-se  $10,0 \pm 0,1$ mg de amostra em base seca para um tubo de ensaio. A hidrólise ácida da amostra é conduzida pela adição de 400  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 72% ao tubo e levada a incubar num digestor, durante três horas a 30°C. Adiciona-se em seguida 4,4 mL de água

destilada e vai novamente a incubar, por um período de 2h30 a 100°C no mesmo digestor. Posteriormente, arrefece-se em gelo, e adicionam-se 200 µL de 2-desoxiglucose como padrão interno. Deste hidrolisado retira-se 1mL para outro tubo e adiciona-se 0,2 mL  $\text{NH}_3$ (25%) e 0,1 mL  $\text{NH}_3$ (3,0 M) contendo 150mg/mL de  $\text{NaBH}_4$  (para a redução dos monossacarídeos a alditóis), num banho de gelo. Esta mistura vai a incubar durante 1 h a 30°C e é novamente arrefecida em gelo. Em seguida adicionam-se 50 µL de ácido acético glacial (para a eliminação do excesso de  $\text{NaBH}_4$ ) com os tubos mergulhados em gelo. Retiram-se 0.3 mL da solução do tubo e adicionam-se 3 ml de anidrido acético e 0.45 mL de 1-metilimidazola para acetilação dos grupos alditol. A mistura é incubada a 30°C durante 30 min e posteriormente arrefecida em gelo. Finalmente são adicionados 3 mL de água destilada (excesso de água para destruir anidrido acético) e 2mL de diclorometano (extracção dos acetatos de alditol). Coloca-se a mistura no agitador vórtex (200 rpm, 30 segundos). A camada aquosa superior é aspirada e repete-se exactamente este procedimento de lavagem, mais uma vez; repete-se novamente o mesmo procedimento, mais duas vezes, apenas com 3 mL de água destilada. Após a remoção da última camada aquosa, o diclorometano é submetido à evaporação sob atmosfera de azoto e, posteriormente adiciona-se 1mL de acetona (repetir adição e evaporação de acetona).

A identificação e quantificação dos açúcares são realizadas por cromatografia gasosa na coluna DB 225 (30m), temperatura do detector 250°C, temperatura do injectore 225°C, temperatura da coluna 220°C (Figura 2.8).



**Figura 2. 8:** Coluna GC-FID (DB 225, 30m).

### 2.3. Caracterização Química LP com lavagem de ácido clorídrico

Para a lavagem ácida das lamas primárias, prepara-se previamente uma solução de ácido clorídrico, de 5%, efectuando uma diluição a partir de uma solução de HCl comercial (37%). Pesam-se  $30,00 \pm 0,01$ g de lamas primárias tal-qual, para um erlenmeyer, por cada 1L de solução de HCl (5%), para que se verifique uma consistência de 3% de lamas. Coloca-se o erlenmeyer com a amostra de lamas pesadas e o volume de solução HCl (5%) numa placa de agitação (Figura 2.9), com o auxílio de um agitador magnético e a temperatura ambiente, durante aproximadamente 24 horas. Findada a digestão, procede-se à lavagem do conteúdo por filtração a vácuo. Transfere-se a amostra filtrada e lavada para um tabuleiro, deixando-a secar por um ou dois dias (Figura 2.10).

Efectuaram-se as mesmas análises executadas na caracterização anterior (secções 2.1. e seguintes), com o mesmo alinhamento e metodologia, realizando todos os ensaios em duplicado.

As lamas primárias com lavagem ácida de HCl apresentam-se como a amostra em estudo nos ensaios subsequentes (secções 2.6. e 2.7.), sendo designadas particularmente por “lamas referência” ou “LP referência” (obtidas antes da extracção com acetona), por oposição ao termo referente às “lamas extraídas” ou “LP extraídas” (obtidas após extracção com acetona).



**Figura 2. 9:** Digestão das lamas primárias iniciais em solução de ácido clorídrico (HCl 5%).



**Figura 2. 10:** Lamas primárias de referência secas ao ar, após lavagem com ácido clorídrico (HCl 5%).

## **2.4. Determinação da recta de calibração da glucose pelo método DNS**

A recta de calibração da glucose é obtida, recorrendo ao método de DNS (ácido 3,5-dinitrilossalicílico) para a determinação de açúcares redutores. Com efeito, prepara-se uma solução de glucose (1,0 mg/mL) e, a partir desta, preparam-se soluções-padrão de concentração variável (0; 0,0125; 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,200; 0,250 e 0,300 mg/mL). Retira-se 1,0 mL a cada padrão para um tubo de ensaio, ao qual se adiciona 1 mL de DNS e leva-se ao banho a 100°C, durante 5 minutos. Retira-se o tubo e arrefece-se num banho de água fria, adicionando posteriormente 10 mL de água destilada. Agita-se bem o conteúdo no vórtex (5000 rpm) e procede-se à leitura da absorvância num espectrofotómetro visível (Figura 2.11). A recta de calibração é então determinada, realizando uma regressão linear da absorvância de todas as soluções-padrão em função da sua concentração.

Este método é aplicado no decurso dos ensaios subsequentes (secções 2.6. e 2.7.).



**Figura 2. 11:** Espectrofotômetro de absorção visível, UVmini-1240, utilizado a 540nm, com percurso óptico de 1mm.

## 2.5. Preparação da solução de celulase

A enzima utilizada para a preparação desta solução, foi a celulase obtida através do fungo *Tricoderma virido*, cujo nome comercial é endocelulase, com o nome de código EC 3.2.1.4 e cuja actividade enzimática é de 4U/mg<sub>substrato</sub>.

Para cada hidrólise enzimática pesam-se 40 mg de lamas primárias referência (base seca) e, segundo *Ferreira et al. 2010*, são necessárias 1500 U por cada 1000 mg de substrato (carga enzimática) de celulase comercial. Assim, pesam-se 300 mg de celulase comercial para um balão volumétrico de 25 mL, perfazendo o restante volume com solução tampão de acetato de sódio (0,05M, pH 5) e reserva-se no frigorífico.

## 2.6. Hidrólise Enzimática de LP

### *Preparação da amostra*

Pesam-se 40 mg (peso seco) de LP referência para um copo e procede-se ao intumescimento da amostra, adicionando 30 mL de solução-tampão de acetato de sódio (0,05 M), sob agitação constante numa placa, durante 24 horas. Submete-se a mistura a filtração por vácuo e pesa-se novamente as lamas intumescidas.

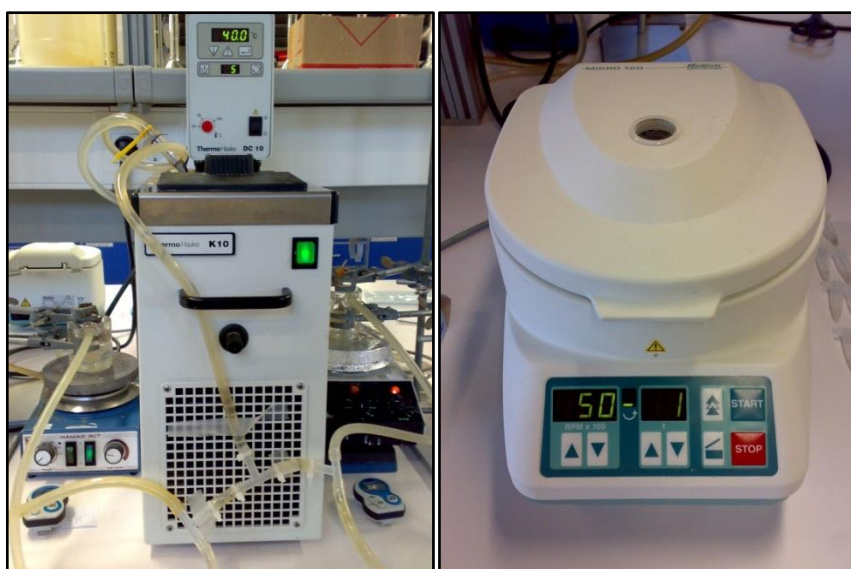


### ***Hidrólise Enzimática***

Coloca-se a amostra intumescida num tubo adequado ao reactor (Figura 2.12a), em banho-maria previamente aquecido a 40°C. Adiciona-se 6,8 mL de solução-tampão (previamente aquecida a 40°C), permanecendo a mistura sob agitação constante.

Determina-se o ponto zero, retirando 0,2 mL da mistura reaccional para um eppendorf e centrifugando a 5000 rpm durante um minuto (Figura 2.12b). Seguidamente, retira-se 0,1mL do sobrenadante do eppendorf para um tubo de ensaio, adicionando-se 1 mL da solução de DNS e 0,9 mL de água destilada. Leva-se o tubo a um banho termostático a 100°C, durante 5 minutos, deixa-se a arrefecer e depois adiciona-se 10 mL de água destilada. Submete-se a agitação no vórtex até a mistura se apresentar com tom homogéneo e, posteriormente, procede-se à leitura da absorvância.

Após a leitura do ponto zero, adiciona-se 1,2 mL da solução de celulase à mistura reaccional e, neste instante inicia-se a hidrólise enzimática, sendo por isso necessário auxiliar toda a etapa com recurso a um cronómetro. Procede-se de forma similar à citada no parágrafo anterior, retirando alíquotas de 0,2 mL de mistura reaccional em intervalos de tempo previamente definidos, sendo que cada intervalo é completado e devidamente anotado aquando da adição da solução de DNS, seguida pelo banho termostático a 100 °C (instante em que a hidrólise enzimática é interrompida).



**Figura 2. 12:** a) Montagem reaccional (esquerda); b) Centrifugadora Zentrifugen, modelo mickro 120 (direita).



## 2.7. Hidrólise Enzimática de LP com Tratamento Hiperbárico

Os ensaios de pressurização das lamas primárias foram executados no aparelho High-pressure System U33, constituído por uma unidade principal móvel e por um termostato de circulação comercial. Os elementos de alta pressão encontram-se a jusante da estrutura de protecção de segurança do equipamento. A amostra a processar encontra-se no vaso de alta pressão, preenchido com o líquido de pressurização, formando um sistema de fecho em rosca. Tanto a temperatura como a pressão são visualizadas no painel de controlo do aparelho, que se situa à frente. Na Tabela 2.1 são apresentadas as principais características do equipamento.

**Tabela 2.1:** Características do equipamento High-pressure System U33.

<b>Intervalo de Pressão</b>	0-700 MPa
<b>Intervalo de Temperatura</b>	-20 a 100°C
<b>Volume do vaso</b>	100mL
<b>Diâmetro do vaso</b>	35mm
<b>Dimensões máximas do invólucro selado</b>	0,34x98mm (90mL)
<b>Líquido de Pressurização</b>	Propilenoglicol : Água (60:40)

### Preparação da amostra

Pesam-se 0,320mg de LP referência para um copo, submetendo-se ao intumescimento com 30 mL de solução-tampão, sob agitação contínua e durante 24 horas. Transfere-se a totalidade do conteúdo do copo para um recipiente de 32mL adequado à pressurização (HDPE), perfazendo o volume restante com a solução-tampão. Desta forma, assegura-se 1% (m/v) de consistência da mistura.

### Tratamento a alta pressão

O referido recipiente foi introduzido num invólucro devidamente selado a vácuo, para minimizar o risco de ruptura durante a pressurização e, posteriormente, introduzido no equipamento, iniciando-se o tratamento hiperbárico. Foram efectuadas diferentes combinações de pressão/tempo para diferentes amostras (LP referência e LP extraídas), esquematizadas na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2:** Combinações de tratamento hiperbárico aplicadas em cada ensaio.

<b>Amostra</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Pressão Exercida (MPa)</b>	<b>Tempo de Pressurização (min)</b>
<b>Lamas referência</b>	1	400	15
	2	500	10
	3	400	5+5+5 (ciclos)
<b>Lamas extraídas</b>	4	400	15

### **Hidrólise Enzimática**

Filtra-se a vácuo o conteúdo do frasco para um copo (previamente pesado) e pesa-se as lamas intumescidas e pressurizadas. Retira-se uma porção equivalente a aproximadamente 40mg em peso seco, repetindo-se o procedimento da hidrólise enzimática, acompanhado pelo método do DNS.

## **Capítulo 3 – Análise e Discussão dos Resultados**

No presente capítulo apresentam-se os resultados obtidos do estudo realizado sobre a caracterização das lamas primárias, assim como sobre o desempenho de toda a metodologia conduzida sob a hidrólise enzimática e o processamento hiperbárico das mesmas. Os resultados são acompanhados pela respectiva análise e discussão, sendo que podem ser consultados todas as tabelas e cálculos auxiliares e intermédios na secção Apêndices, que auxiliam a compreensão dos dados. É importante salientar que, no decorrer deste capítulo, nem todos os resultados obtidos podem ser comparados com dados da literatura, atendendo à inexistência dos mesmos. Assim e sempre que pertinente, os resultados serão comparados com valores para pastas cruas de *Eucalyptus globulus*, atendendo à sua similaridade.

### 3.1.Caracterização Química das Lamas Primárias (LP)

Com a finalidade de conhecer a composição das lamas primárias, para uma acurada compreensão do estudo posterior, realizou-se uma caracterização inicial da matéria-prima, cujos parâmetros em análise são apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1:** Resultados para a caracterização química das lamas primárias iniciais.

Parâmetros a analisar	LP inicial (%)
Teor de cinzas (a 525 °C)	45,3
Teor de matéria orgânica	54,7
Carbonatos	40,9
Extractáveis em acetona	0,66

Verifica-se que a matéria-prima inicial apresenta uma forte contribuição mineral, traduzida pelo teor de cinzas, podendo ser considerada como impurezas a serem removidas.

A forte presença de carbonatos deve-se ao facto de ao tratamento de efluentes serem admitidas muitas correntes líquidas, nomeadamente, do processo de caustificação e das águas brancas provenientes das máquinas de papel. Este elevado registo influencia o

reduzido teor de extractáveis (0,66%), na medida em que os carbonatos (nomeadamente, carbonato de cálcio) dificultam a extracção dos mesmos e não são solubilizados pela acetona. Também a forte presença de sais nas fibras das lamas condiciona a determinação do teor de extractáveis, uma vez que complexam com os grupos carboxílicos, impedindo que os componentes sejam extraídos na forma de sal.

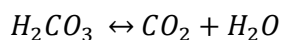
Efectuou-se uma nova caracterização da matéria-prima, desta vez referente às lamas primárias com lavagem prévia de ácido sulfúrico (4% m/m) para que sejam neutralizadas e, posteriormente, outra caracterização referente à lavagem com ácido clorídrico (5% m/m) com 3% (m/v) de consistência de lamas. A razão pela qual se decidiu utilizar o ácido sulfúrico (ao invés de outro), deve-se à sua abundância na indústria de pasta e papel e, portanto, verifica-se uma maior facilidade na sua aquisição e a custo reduzido. O custo associado à aquisição do ácido clorídrico é mais elevado e este apresenta maior impacto na corrosão do material dos equipamentos.

Os parâmetros de interesse a analisar foram alargados e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Resultados da caracterização química das lamas primárias com lavagem ácida de ácido sulfúrico e clorídrico.

Parâmetros a analisar (%)	LP tratadas com	LP tratadas com
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HCl
Teor de cinzas (a 525 °C)	55,5	1,7
Teor matéria orgânica	44,6	98,3
Carbonatos	0,98	0,40
Extractáveis em acetona	7,5	1,5
Lenhina Insolúvel	2,1	5,6
Lenhina Solúvel	0,24	0,25
Lenhina Total	2,3	5,9

A finalidade desta neutralização das lamas com ácido sulfúrico (4% m/m), reside no facto de se fazerem reagir os carbonatos presentes na amostra inicial que, na presença do ácido, convertem-se em sulfato de cálcio (Equação 17).



Desta forma, compreende-se a diminuição registada no teor de carbonatos para este grupo amostral (0,98%), por comparação ao teor obtido para a amostra inicial (40,9%). A presença de carbonatos nas lamas primárias influencia as etapas de caracterização posteriores, sobretudo aquando das hidrólises ácidas sequenciais no ensaio de determinação do teor de lenhina. Uma vez que, nesta etapa inicial se garante a reacção dos carbonatos na presença do ácido sulfúrico, rectifica-se a interferência que estes teriam, na medida em que o ácido sulfúrico responsável pelas hidrólises no ensaio da lenhina reagiria primeiramente com os carbonatos presentes, antes de ocorrer a deslenhificação. Assim, no fim do período de tempo requerido para o ensaio, o processo de deslenhificação não seria completado. Ainda que, com a neutralização das lamas iniciais o teor de carbonatos seja corrigido, por outro lado estes passam a existir sob a forma de sulfato de cálcio (Equação 17), conferindo um aumento no teor de matéria inorgânica da amostra, que é confirmado pelo aumento do teor de cinzas desta amostra, 55,5%, por oposição aos 45,3% inicialmente registados pela amostra inicial. Esta constatação permite questionar a relevância deste passo, na medida em que um elevado teor em cinzas das LP, dificulta a acessibilidade da enzima à celulose, comprometendo a hidrólise enzimática e a quantificação de açúcares redutores, o que dificulta fortemente a sua valorização económica. Por outro lado, verifica-se a eficiência da lavagem das LP com ácido clorídrico na redução do teor de cinzas, justificada pela diferença registada nas LP iniciais (45,3%) por oposição às LP lavadas (1,7%).

A etapa de tratamento com ácido clorídrico de 5% m/m (secção 2.3.) é realizada, para que se promova uma melhor acessibilidade aos componentes fibrilares celulósicos. O ácido clorídrico sendo um ácido mais forte, garante a eliminação dos carbonatos presentes (Equação 18), sob a forma de sal solúvel. Com efeito, verifica-se que o teor de carbonatos é significativamente inferior (0,40%), assim como o teor de cinzas (1,7%).



O aumento no teor de extractáveis registado tanto para as LP tratadas com ácido clorídrico (1,5%) como para as tratadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (7,5%), face aos registados nas LP inicial (0,66%), pode ser explicado pelo sucesso da remoção dos sais metálicos (secção 3.1.1.) que antes se encontravam complexados com os grupos carboxílicos dos extractáveis. Uma vez que os sais metálicos, nomeadamente os sais de cálcio, foram removidos, então há maior probabilidade de isolamento dos componentes extractáveis, para que se consigam extrair e aumentar o seu teor. A ampla diferença registada no teor de extractáveis para ambas as amostras de LP (Tabela 3.2) não é, de todo, passível de ser concretamente justificada, uma vez que seriam necessários mais testes, nomeadamente a nível microscópico. No entanto, é possível inferir-se acerca da relação com o teor de cinzas (Tabela 3.2), pelo que se admite que aquando da remoção das cinzas na superfície das fibras, os componentes extractáveis agregados em torno das cinzas sejam também removidos com a lavagem.

O teor de lenhina total para ambas as amostras de LP é claramente díspar entre elas, sendo que o valor registado para LP com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é o mais coerente com os valores normalmente obtidos para pastas cruas de eucalipto (*Pinto et al., 2005*). Por observação da Tabela 3.2., verifica-se que o teor de lenhina solúvel é semelhante entre ambas as amostras e que a distinção reside nos valores de lenhina residual (insolúvel). As lamas primárias, ao resultarem do tratamento primário de efluentes líquidos, naturalmente acrescem o seu teor de lenhina, sendo ligeiramente superior ao das pastas cruas (*Sequeira, 2005*). No entanto, o elevado teor de lenhina residual das LP com HCl pode ser discutido atendendo à proveniência diversificada das fibras que compõem as LP, admitindo-se a presença de fibras de pastas cruas mal cozidas (incozidos), aleatoriamente, em maior incidência nesta amostra do que na referente às LP com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A existência de um maior teor de lenhina na superfície das fibras dificulta a reactividade da celulose e pode constituir um impedimento à capacidade de digestão enzimática. Seria pertinente prosseguir, com base nesta inferência, para um estudo com técnicas degradativas e não-degradativas (UV-VIS, UV-IR, RMN), que permitisse a compreensão do acréscimo de lenhina residual das lamas.

### 3.1.1. Análise de Metais

É importante determinar o conteúdo dos cátions metálicos, para prever uma possível eliminação com tratamentos adequados, quando necessário, auxiliando na diminuição da toxicidade do subproduto. A lavagem ácida das LP permite a redução dos cátions metálicos, não afectando significativamente as propriedades das fibras. Os resultados para a presença de metais nas amostras inicial, com lavagem de ácido sulfúrico (4% m/m) e com lavagem de ácido clorídrico (5% m/m), são apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3:** Presença de cátions metálicos nas amostras de lamas primárias inicial e com lavagem ácida de ácido sulfúrico e clorídrico.

Metais (%total)	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe
<b>LP inicial</b>	2,4	0,4	0,09	67,2	0,08	0,2
<b>LP H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,3	0,05	-	58,8	0,004	0,1
<b>LP HCl</b>	-	0,07	-	0,6	-	0,2

Verifica-se que, no geral, a lavagem com ácido clorídrico exhibe maior êxito na redução e remoção dos cátions metálicos, do que a lavagem com ácido sulfúrico. A presença do cálcio diminui ligeiramente com a lavagem de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, todavia não é significativo pois o mesmo deixa de estar na forma de carbonato e transforma-se em sulfato de cálcio. A lavagem com HCl revela-se muito mais preponderante na redução da presença de cálcio para níveis muito minorados. Regista-se uma ligeira diferença na redução da presença do magnésio e do ferro nos dois tipos de lavagem ácida, que pode dever-se a contaminações no desenrolar da análise. Na determinação da presença do sódio, potássio e manganésio, ambas as lavagens demonstram eficácia na redução e remoção dos mesmos.



### 3.1.2. Caracterização e Quantificação dos Açúcares Neutros

Durante a lavagem ácida das lamas primárias, ocorre o fracionamento parcial das cadeias dos polissacarídeos.

É de reforçar a importância na determinação do teor de hemiceluloses, uma vez que são fonte de grupos carboxilo. A presença de grupos carboxilo promove uma aproximação dos cátions metálicos que, atendendo à sua densidade de carga, têm a capacidade de atrair a água, envolvendo as fibrilas e diminuindo a agregação fibrilar. Assim, quando as fibras das lamas são intumescidas, regista-se um aumento do espaço interfibrilar.

As hemiceluloses ao precipitarem nas lamas, são removidas aquando da lavagem, em particular grande parte das xilanas, glucomananas, glucanas e substâncias pécicas, pelo que o teor de celulose é realçado.

**Tabela 3.4:** Presença de açúcares neutros (%m/m) nas amostras de lamas primárias com lavagem ácida de ácido sulfúrico e clorídrico.

Monossacarídeos (%)	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu
<b>LP H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	4,2	2,8	0,1	3,9	11,5	6,9	2,9	67,7
<b>LP HCl</b>	0,2	0,1	0,1	0,2	5,9	1,1	0,1	92,3

Por observação da Tabela 3.4, verifica-se que o maior teor de açúcar é atribuído à glucose, em ambas as amostras, o que sugere a maior abundância de celulose nas LP. O teor de xilose é apresentado como o segundo açúcar em maior incidência em ambas as amostras, demonstrando que as hemiceluloses das LP são predominantemente xilanas (glucuronoxilanas). A contribuição relevante de manose nas LP lavadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> indicia a presença de glucomanas. As pequenas contribuições de ramnose, arabinose e galactose sugerem a presença de pectinas.

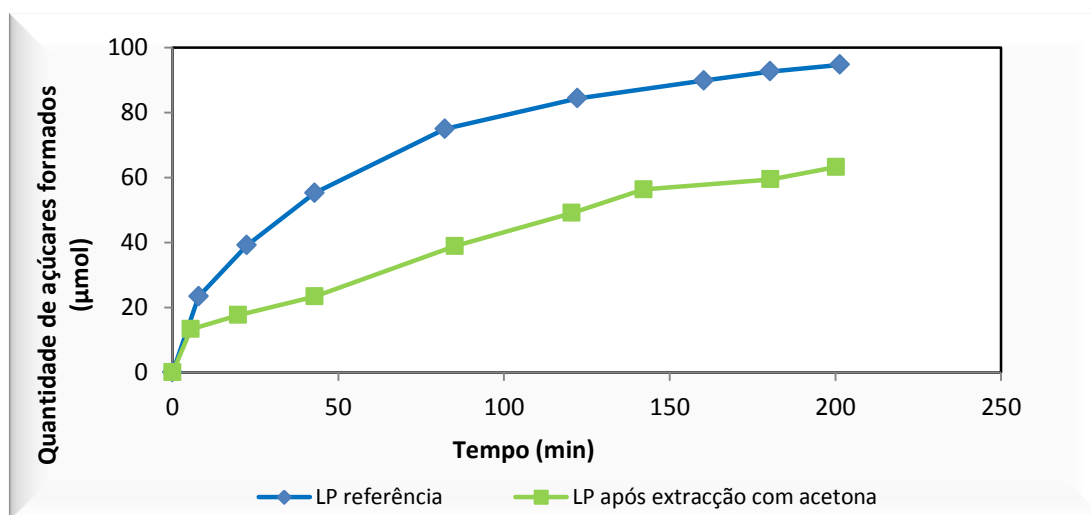
É possível apurar que, comparando ambas as lavagens, as LP HCl apresentam uma remoção mais acentuada de hemiceluloses no geral e, em particular, de xilanas (glucuronoxilanas). Esta eliminação implica um aumento da agregação fibrilar, afectando a acessibilidade às fibras (Rebuzzi e Evtuguin, 2006). Não obstante desta limitação, a lavagem ácida das lamas primárias é imperativa para a remoção, tanto quanto possível, das cinzas e carbonatos, sendo que a lavagem com ácido clorídrico revelou os melhores

resultados (secção 3.1). Com efeito, nesta análise as LP com lavagem de HCl demonstram melhores resultados, na medida em que foi possível alcançar uma maior proporção de glucose face aos restantes monossacarídeos.

### 3.2. Hidrólise Enzimática das Lamas Primárias

Com o intuito de sacarificar as lamas, resíduo rico em fibras celulósicas, para produção de produtos de valor acrescentado, procede-se à hidrólise enzimática com celulase, conforme descrito na secção 2.6. O efeito da digestão enzimática nas fibras celulósicas é avaliado de acordo com a formação de açúcares redutores. Nos ensaios subsequentes, a amostra “LP referência” corresponde às lamas primárias lavadas com ácido clorídrico, uma vez que obtiveram resultados melhores e mais coerentes na caracterização química (secções 3.1, 3.1.1 e 3.1.2).

Os resultados da hidrólise enzimática das LP referência, antes e após extracção com acetona, estão ilustrados na Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência e LP referência após extracção com acetona.

Observa-se, claramente, uma notória diferença no comportamento de ambas as amostras. As LP referência apresentam uma curva melhor definida, sugerindo uma

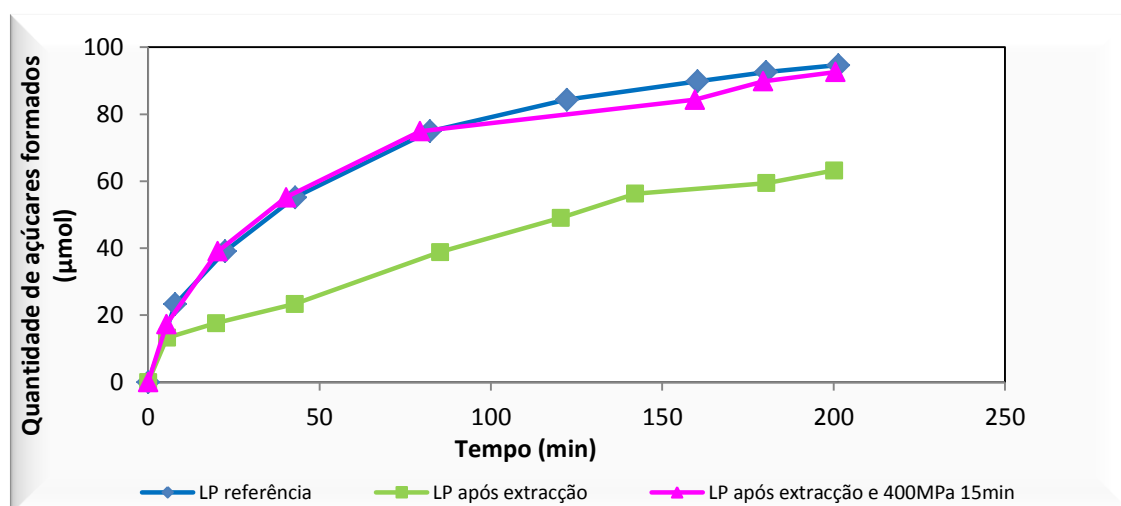
estabilização num patamar, a partir dos 150 minutos de reacção, com uma quantidade de açúcares redutores formados aproximadamente o dobro dos registados para a curva das LP extraídas. Verifica-se assim, que os resultados para as lamas primárias sem extracção com acetona, são mais promissores.

A razão pela qual é pertinente averiguar o desempenho da hidrólise enzimática das LP extraídas, reside na interacção da acetona com a água. A extracção com acetona promove a remoção de extractáveis e outros componentes residuais da superfície das fibras, libertando-a e permitindo um melhor acesso da água e da enzima. No espaço interfibrilar existe sempre uma quantidade mínima de água que, em contacto com a acetona aquando da extracção e atendendo aos fenómenos de polaridade, vai ser arrastada e as fibras adjacentes aglutinam-se, ocupando o espaço que antes existia entre elas. Naturalmente, o transporte enzimático à superfície e no interior da fibra será fortemente dificultada.

A referida agregação fibrilar pode ser, presumivelmente, atribuída a um conjunto de fenómenos físico-químicos, que podem ter ocorrido aquando da extracção das lamas com acetona e a da sua secagem ao ar, designados por hornificação. Este fenómeno, que está associado ao rearranjo das fibrilas de celulose e dos agregados interfibrilares, leva ao endurecimento da fibra e ao colapso da sua superfície, bem como à contracção do seu tamanho (Rebuzzi e Evtuguin, 2006). Com o intuito de suprir esta contrariedade, foram desenvolvidos estudos que revelaram que a presença de glucuronoxilanas impede fisicamente a forte agregação das fibrilas adjacentes, durante a secagem, aumentando a acessibilidade às mesmas e diminuindo o efeito causado pela hornificação (Rebuzzi e Evtuguin, 2006). A partir da análise de açúcares neutros (secção 3.1.2), verificou-se que as hemiceluloses predominantes nas LP referência são as xilanas, portanto as glucuronoxilanas. Como tal, é pertinente depreender que o efeito causado pela hornificação nas LP referência após extracção com acetona, poderia ser mais proeminente do que o demonstrado.

### 3.2.1. Efeito do Tratamento Hiperbárico nas LP antes e após extracção com acetona

A pressurização da amostra de LP após extracção foi aplicada com a finalidade de forçar a abertura de espaços interfibrilares, para que a celulase consiga penetrar na parede celular e desempenhe a sua acção hidrolítica na degradação da celulose. Na Figura 3.2 demonstra-se o resultado para a pressurização a 400MPa, durante 15 minutos, das LP extraídas por comparação à amostra análoga sem tratamento hiperbárico e à amostra de LP referência. As condições de pressurização foram escolhidas, atendendo aos melhores resultados obtidos pela literatura de estudos anteriores (Ferreira *et al.*, 2011), para hidrólises enzimática de pasta branca.

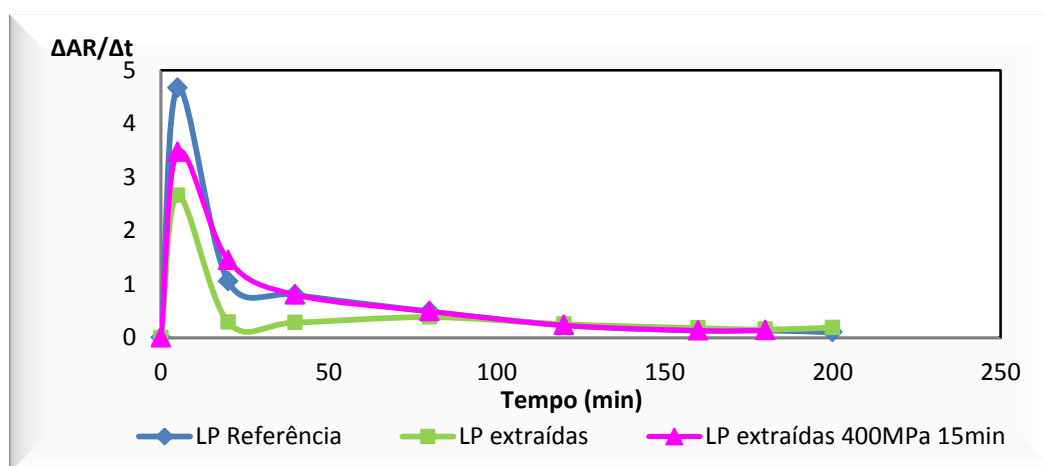


**Figura 3.2:** Formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência, LP após extracção com acetona e LP extraídas com processamento a alta pressão (400 MPa, 15 min).

É possível corroborar a acção do tratamento hiperbárico, na medida em que se verifica uma melhoria significativa no comportamento da reacção enzimática, pelo aumento da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo de reacção. As fibras das LP extraídas com acetona demonstram assim que, com a pressurização as suas microfibrilas (MF) afastam-se ligeiramente por estarem hidratadas, permitindo a passagem de água e enzima. No entanto, este resultado positivo não é suficiente para suprir

completamente o efeito imprimido pelo fenómeno de hornificação, atendendo à similaridade obtida para as curvas referência e com alta pressão.

Com o intuito de se avaliar a evolução na velocidade da hidrólise enzimática ao longo do tempo de reacção, as curvas integrais dos resultados obtidos (Figura 3.2) foram analisadas em termos diferenciais e encontram-se ilustradas na Figura 3.3.



**Figura 3.3:** Representação diferencial da formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência, LP extraídas e LP extraídas com processamento a alta pressão (400 MPa, 15 min).

É possível observar a existência de um máximo na curva diferencial para cada amostra, aproximadamente durante os primeiros 5 minutos de reacção. O registo deste pico nos instantes iniciais é indicativo da maior acessibilidade à superfície da fibra por parte da enzima, sendo que a amostra LP referência demonstra uma maior velocidade de reacção inicial, comparativamente às restantes duas amostras. Nos instantes seguintes a quantidade de açúcares redutores formados por intervalo de tempo cai abruptamente, indicando uma redução acentuada na velocidade de reacção, pois diminui a acessibilidade para o interior da fibra, entre a parede celular primária e a secundária.

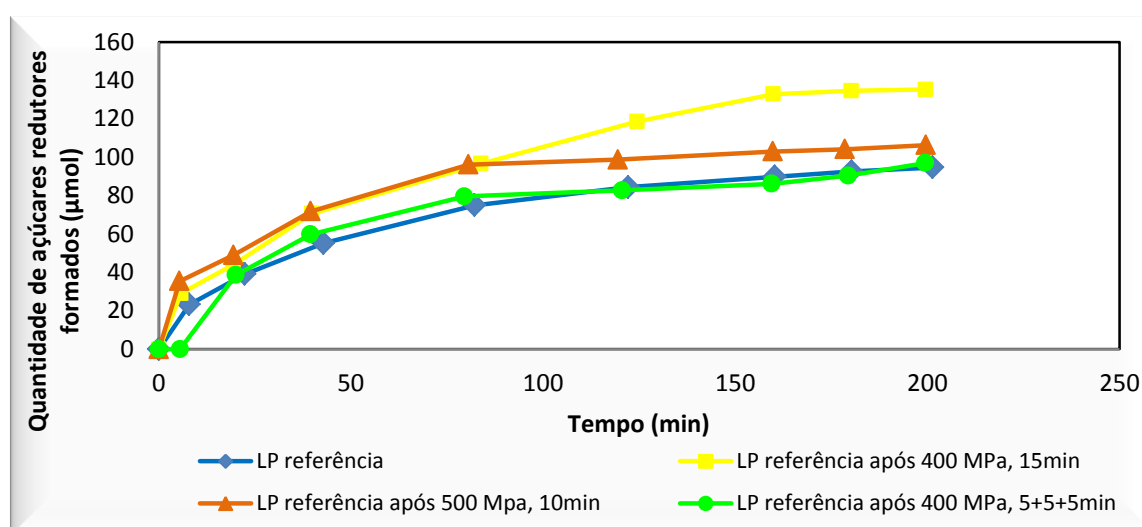
### 3.3. Influência do Tratamento Hiperbárico na Hidrólise Enzimática nas LP referência

De forma análoga à execução desempenhada na secção anterior (3.2.), procedeu-se à submissão das amostras de LP referência ao pré-tratamento hiperbárico, segundo os seguintes conjuntos de condições operatórias:

- Amostra LP, 400 MPa, 15 minutos
- Amostra LP, 500 MPa, 10 minutos
- Amostra LP, 400 MPa, 5+5+5 minutos (por ciclos)

As condições do primeiro ensaio (400 MPa, 15 minutos) foram escolhidas como ponto de partida, atendendo ao êxito dos resultados demonstrados anteriormente. A escolha das condições operatórias dos ensaios seguintes surgiu como uma proposta, com o objectivo de se optimizarem os resultados. O tratamento de LP sujeitas à aplicação de 400 MPa durante ciclos de 5 minutos, propõe a pressurização da amostra durante 5 minutos, seguida de uma queda de pressão (descompressão) até atingir a pressão inicial, permanecendo assim por 4 segundos e voltando novamente a submeter a amostra a 400 MPa. Portanto, são ciclos combinados de pressurização alternados com queda de pressão.

Os resultados dos três ensaios experimentais e da curva de referência sem tratamento hiperbárico encontram-se ilustrados na Figura 3.4.



**Figura 3.4:** Formação de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo de reacção enzimática, para as LP referência e LP referência com processamento por alta pressão (400 MPa, 15 min; 500 MPa, 10 min; 400 MPa, 5+5+5 min).

Através da Figura 3.4 verifica-se que todos os ensaios com alta pressão representam uma melhoria geral no desempenho da hidrólise enzimática e na quantificação de açúcares redutores, comparativamente aos dados da curva de referência de LP sem tratamento hiperbárico. É possível inferir que as fibras rearranjam-se e as MF abrem espaços entre si, permitindo melhor acessibilidade. Regista-se um acréscimo de degradação da celulose durante a reacção enzimática, que culmina ao atingir um patamar constante, aproximadamente aos 200 minutos. Efectivamente, esta acessibilidade assume maior relevância no início da hidrólise, assinalando uma maior quantidade de açúcares redutores formados para os primeiros 100 minutos, e torna-se menos significativa à medida que a hidrólise se desenrola nos 100 minutos seguintes.

#### **Análise de LP, 400 MPa, 15 minutos**

Claramente, os resultados obtidos para o ensaio a 400 MPa e 15 min evidenciam uma maior evolução e sugerem um considerável aumento na quantidade de açúcares redutores formados. De facto, aplicação do processamento hiperbárico com as referidas condições de operação favorece de tal modo o intumescimento e reorganização das fibrilas nas fibras das lamas. Assim, parte das suas fibrilas afastam-se e dispersam-se parcialmente, atingindo um maior estado de hidratação. Todos estes fenómenos contribuem eficazmente para a disponibilização do espaço intrafibrilar e, conseqüentemente, para a maior acessibilidade da acção enzimática da celulase sobre as ligações glicosídicas da celulose, que outrora se encontravam impedidas.

#### **Análise de LP, 500 MPa, 10 minutos**

Relativamente ao ensaio a 500 MPa e 10 min, observa-se uma melhoria face aos dados de referência, apresentando uma evolução constante na formação de açúcares. No entanto, quando comparado com o ensaio anteriormente discutido, ambos sugerem um progresso equiparado até aproximadamente 100 minutos de reacção e depois diferenciam-se significativamente. Deste modo, revela-se que o presente ensaio não constitui uma vantagem face ao anterior. Esta constatação pode ser atribuída ao facto de que, ao

submeterem-se as fibras a alta pressão, as MF que se encontram agregadas entre si na parede celular, afastam-se o suficiente para permitirem o acesso de água e de enzima. Dado que as fibrilas elementares (EF) permanecem agregadas no interior das MF, ao elevar ainda mais a pressão (neste caso para 500 MPa), as MF desintegram-se parcialmente e promovem a dispersão das EF pela matriz fibrilar (na parede secundária), permitindo que estas sofram hidratação e se expandam. Deste modo, a área superficial sofre um aumento, porém a área intersticial é diminuída, sendo a que representa a área livre para a passagem da água e da enzima.

Pressupõem-se assim que, as fibras das lamelas primárias respondem favoravelmente à introdução da alta pressão, mas nem sempre um maior acréscimo na pressão de processamento implica um progresso.

Uma possibilidade para contornar este impedimento seria prosseguir para um estudo alusivo à refinação de fibras. Com este estudo, presumir-se-ia que com a refinação a parede primária das fibras poderia ceder e, recorrendo ao processamento hiperbárico, provocar-se-ia a expansão das MF sem se desintegrarem, obtendo-se melhores resultados até mesmo a 500 MPa (pois deixaria de haver uma barreira a comprimir).

#### **Análise de LP, 400 MPa, 5+5+5 minutos**

A implementação do ensaio a 400 MPa em ciclos de 5 minutos, deliberadamente incidiu sobre a tentativa de otimizar os resultados obtidos para o melhor ensaio realizado (400 MPa a 15 minutos). Dado que, a elevada quantidade de açúcares redutores formados para esta amostra processada por alta pressão ao longo da reacção enzimática, é indicativo do acesso facilitado da celulase para que possa provocar a clivagem das ligações glicosídicas da celulose. Portanto, admitir-se-ia que manipulando a pressão ao se introduzir ciclos de 5 minutos, modificar-se-iam as propriedades das fibras de celulose duma forma não degradativa. Ao se aplicar 400 MPa durante os primeiros 5 minutos, as fibras reorganizam-se e as MF alastram-se. Seguidamente, permite-se a queda de pressão até atingir a pressão atmosférica e, após uma pausa de 4 segundos, aplica-se novamente 400 MPa, promovendo novamente o afastamento das MF. Contudo, comprova-se que o intervalo de ciclo escolhido pode ser ainda muito reduzindo, não sendo suficiente para que as MF se afastem



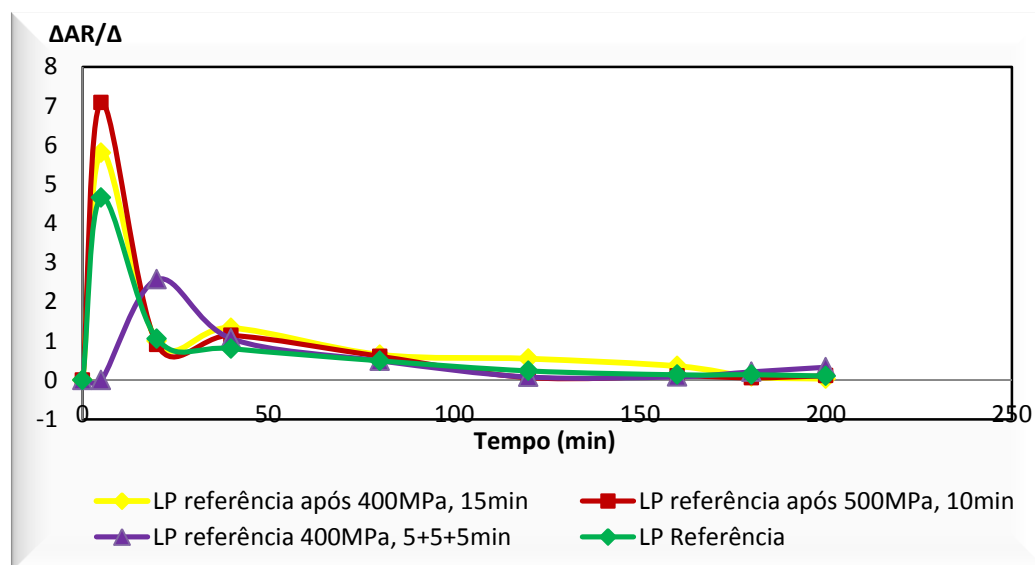
o necessário (e admitindo que não regridem à posição espacial inicial), para que o acesso da água e da celulase seja facilitado ao ponto de hidrolisar completamente. Não obstante das constatações obtidas, seria de enorme interesse proceder a análises ao nível de RAMAN ou difracção por RX, para uma acurada interpretação dos resultados e formulação de conclusões.

Por observação da Figura 3.4, não é possível validar de forma irrefutável este estudo, dado que não se registam progressos acentuados na sua totalidade. Verifica-se que se consegue uma ligeira facilidade no acesso inicial da celulase à superfície da fibra, atendendo aos valores registados para os primeiros 100 minutos, por comparação com os dados da curva referência sem processamento hiperbárico. No entanto, esse acesso não é tão proeminente para que se considere uma vantagem face aos dados de referência, confirmando-se pelos valores registados nos 100 minutos seguintes.

Todavia, este avanço nas condições operatórias deste ensaio, representa sempre um enorme préstimo para este estudo, onde existe todo um leque de opções viáveis passíveis de exploração. Propõem-se para futuros estudos e trabalhos, aumentar os intervalos de cada ciclo de pressão, bem como manipular a temperatura de pressurização de forma combinada e/ou isolada; também a introdução de processamento mecânico poderá forçar uma maior abertura interfibrilar e, seguidamente, aplicar o processamento por alta pressão com ciclos. Outra hipótese poderia ser a acção combinada de celulase e hemicelulase durante a hidrólise enzimática de LP referência, com o intuito de se destruir completamente a parede primária (P1); interromper-se-ia então a reacção com um aumento da temperatura e submeter-se-ia a amostra ao tratamento hiperbárico, analisando por fim o efeito causado na quantidade de açúcares redutores formados.

### **3.3.1. Análise das curvas diferenciais de hidrólise enzimática**

Na Figura 3.5 encontram-se os resultados das curvas diferenciais dos três ensaios realizados com pressurização e a curva referência, na qual se apresenta a variação da quantidade de açúcares redutores formados ( $\Delta AR$ ) por cada intervalo de tempo ( $\Delta t$ ), ao longo da hidrólise enzimática.



**Figura 3.5:** Representação diferencial da formação de açúcares redutores ao longo do tempo de reação enzimática, para as LP referência e LP referência com processamento por alta pressão (400 MPa, 15 min; 500 MPa, 10 min; 400 MPa, 5+5+5 min).

Verifica-se que nos primeiros instantes há uma maior acessibilidade à celulose, traduzida pela elevada velocidade inicial de reação; as fibrilas encontram-se mais afastadas entre si, permitindo o acesso da enzima e, após a sua ação hidrolítica, o consequente aumento da formação de AR. Há maior formação de AR nos instantes iniciais, sugerindo um maior e veemente acesso enzimático na superfície da fibra. À medida que decorre o tempo de hidrólise, ocorre uma diminuição da quantidade de AR formada, porém contínua, indicativo de impedimentos à penetração enzimática no interior da fibra.

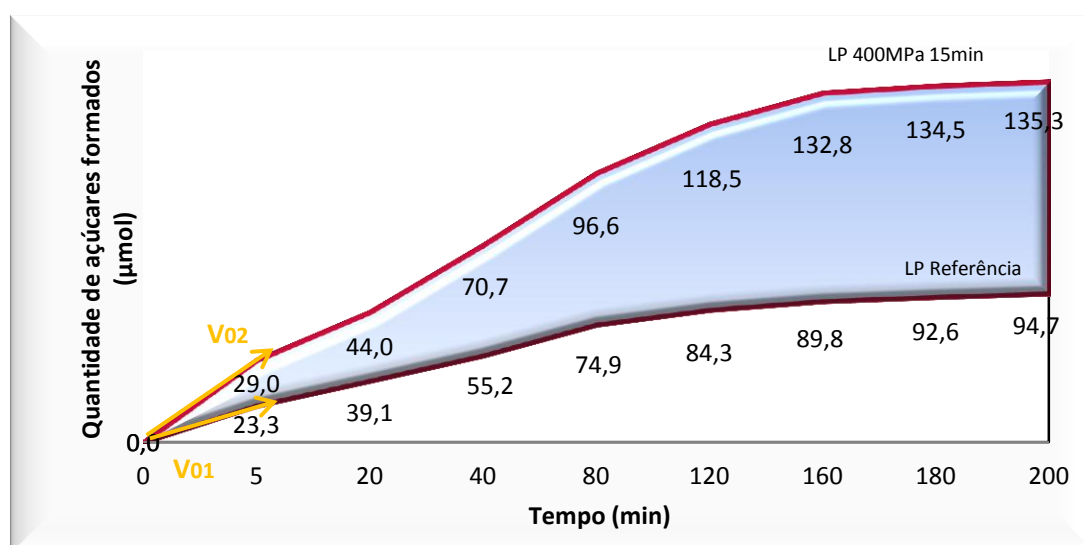
Com 500 MPa, consegue-se uma maior velocidade inicial, o que permite inferir acerca de um acesso mais facilitado à superfície da fibra, bem como da abertura da parede celular e rearranjo das MF, quantificando uma maior proporção de AR formados do que a 400 MPa. No período de tempo seguinte (dos 20 aos 70 min, aproximadamente), ambas as curvas se comportam de forma muito semelhante. A partir deste instante, o resultado para 400 MPa é claramente melhor do que a 500 MPa, mantendo-se mais acima, sugerindo uma maior formação de AR. Desta forma, confirma-se a teoria de que, com um acréscimo de pressão há um melhor rearranjo das MF permitindo o acesso da enzima nos primeiros

intervalos de tempo; com a continuação da alta pressurização, as MF hidratam-se e dilatam de tamanho, estreitando o espaço intermicrofibrilar, expandindo as EF que se reorganizam: admite-se assim um aumento da área superficial, atendendo às reduzidas dimensões das EF, e uma diminuição do espaço livre para a penetração da enzima. Deste modo, confirma-se que as condições mais adequadas são a 400 MPa durante 15min.

Relativamente aos dados ilustrados na Figura 3.5, referente ao ensaio da pressurização a 400 MPa durante ciclos de 5min, verifica-se um atraso na velocidade inicial de reacção, permitindo inferir acerca de um impedimento na penetração da enzima na superfície da fibra. Nos instantes seguintes, há um aumento na velocidade (um pequeno pico), traduzindo-se numa maior formação de AR. Este atraso no máximo da curva de velocidade inicial sugere que o transporte enzimático desenrola-se a um nível mais interior, entre a parede primária e secundária da fibra, contrastando com os restantes resultados que sugerem a difusão enzimática à superfície. Seguidamente, ocorre um declínio, indicativo da diminuição da quantidade de AR formada. De uma forma geral, conclui-se que com pressurização por ciclos de 5 minutos, não se consegue um melhor acesso na superfície da fibra, havendo menor formação de AR, o que não constitui uma vantagem perante os outros dois ensaios. O porquê desta constatação ainda permanece desconhecido e propõe-se como alvo de estudos futuros. Com estas condições, admite-se um melhor rearranjo das fibrilas, tornando o seu empacotamento mais coeso e ordenado, pelo que se promove o impedimento da enzima ou de água. Com efeito, para o objectivo do estudo desta dissertação que se desenrola sobre a avaliação do efeito hiperbárico no melhoramento do acesso enzimático aos domínios fibrilares das LP, este resultado não se revela uma vantagem. Porém, estas condições de operação podem presumivelmente resultar para outra finalidade. Por exemplo, quando se pretender um melhor empacotamento que impeça o acesso enzimático ou de outra natureza. É uma revelação interessante que permite inferir acerca de desenvolvimentos futuros na área em questão.

### 3.3.2. Efeito hiperbárico no melhoramento da sacarificação das LP referência

Por análise da discussão dos resultados no presente capítulo, verifica-se que os dados obtidos para o ensaio das LP referência a 400 MPa e 15 min, são os mais promissores, atendendo ao acréscimo da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo de reacção. De tal modo que, é pertinente quantificar esse grau de melhoria para uma acurada interpretação dos dados e de toda a tónica associada à implementação de um pré-tratamento por alta pressão.



**Figura 3.6:** Diferença na quantidade de açúcares redutores (AR) formados ao longo do tempo de reacção, entre LP referência e LP após processamento a 400 MPa durante 15 minutos

Na Figura 3.6 estão representadas as curvas obtidas para as hidrólises das LP referência, com e sem tratamento hiperbárico (secção 3.3). Conforme foi analisado e discutido anteriormente, a curva superior traduz a maior formação de açúcares redutores face aos dados referência (curva inferior). Os dados ilustrados acima representam uma dependência integral, portanto, a área existente entre ambas as curvas corresponde à melhoria imprimida pelo tratamento hiperbárico no desempenho enzimático sobre as lamas primárias. Assim, escolhendo os dois pontos de ambas as curvas que traduzem a maior diferença,

$$\frac{135,3 - 94,7}{94,7} \times 100\% = 42,9\%$$

[19]

comprova-se que é possível alcançar um acréscimo da quantidade de açúcares redutores formados de cerca de 43%, para as referidas condições operatórias.

Da mesma forma, é possível comparar as velocidades iniciais de ambas as curvas e inferir acerca do aumento da mesma com o processamento por alta pressão. Assim e através da esquematização dos vectores  $v_{01}$  e  $v_{02}$  ilustrados na Figura 3.6,

$$\frac{v_{02}-v_{01}}{v_{02}} \times 100\% = \frac{5,8-4,7}{4,7} \times 100\% = 24\% \quad [20]$$

demonstra-se que é possível alcançar um aumento de cerca de 25% na velocidade inicial de reacção da hidrólise enzimática das referidas amostras de LP, recorrendo a um tratamento hiperbárico prévio.

É de extrema relevância efectuar um paralelismo acerca dos patamares atingidos pelas referidas amostras (Figura 3.6), com resultados obtidos na literatura (Ferreira *et al.* 2011) para pastas *kraft* branqueadas também de *Eucalyptus globulus*, com as mesmas condições operatórias (tanto na pressurização prévia, como na hidrólise enzimática). Verifica-se que, as amostras referência e com processamento a 400 MPa durante 15 min de pastas *kraft* branqueadas, conseguem suplantar os resultados finais obtidos nesta dissertação em aproximadamente 50%, tanto nos instantes iniciais de reacção como no fim (Ferreira *et al.* 2011). Esta evidência assume um maior interesse, na medida em que a matéria-prima de ambos os estudos provém da fábrica integrada da Portucel de Setúbal. A diferença registada na ordem dos 50% é naturalmente entendida, atendendo ao facto de que as laminas primárias, originárias dos efluentes residuais primários das várias etapas do processo de pasta, apresentam um teor de lenhina superior ao das pastas branqueadas.



## Conclusão

Esta dissertação desenvolveu-se sobre uma estratégia definida pela introdução de um tratamento a alta pressão, assim como pelo respectivo efeito provocado na hidrólise enzimática de lamas primárias de *Eucalyptus globulus*, concluindo que é bastante eficiente na melhoria da quantificação de açúcares redutores formados.

Através da caracterização química da matéria-prima inicial, o maior inconveniente para a viabilidade da sacarificação de lamas primárias, é o elevado teor de cinzas (~45%), incluindo o teor de carbonatos (~41%); através da mesma análise, obteve-se ~0,7% para o teor de extractáveis, em acetona. A pré-lavagem com ácido clorídrico foi capaz de suprir esta limitação, contrariamente à pré-lavagem com ácido sulfúrico, remetendo para níveis mínimos os teores de cinza (~2%) e carbonatos (0,4%). O teor de extractáveis das LP lavadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (~8%) foi inesperadamente superior ao registado para LP com HCl (~2%). O teor de lenhina residual de ambas as amostras é bastante díspar, em que os ~2% de LP tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contrastam com os ~6% registados para LP tratadas com HCl.

Na remoção dos catiões metálicos, em particular no decréscimo da presença de cálcio, as lamas tratadas com ácido clorídrico também evidenciaram os melhores resultados, bem como na quantificação de açúcares neutros, obtendo-se uma maior proporção de glucose face aos restantes monossacarídeos.

A hidrólise enzimática de lamas primárias, obtidas após extracção com acetona, revelou que estas não constituem uma vantagem para o acréscimo da quantidade de açúcares redutores, por comparação com as lamas primárias antes da extracção (lamas referência), registando-se fenómenos impeditivos, nomeadamente a hornificação.

A aplicação do tratamento hiperbárico nas lamas referência manifestou um claro impacto positivo, no aumento da quantidade de açúcares redutores, bem como na velocidade inicial de reacção. As condições operatórias referentes ao conjunto 400 MPa / 15 min demonstraram os resultados mais promissores e com maior nível de significância, na medida em que adoptando esta estratégia, é possível alcançar um acréscimo de cerca de 43% na quantidade de açúcares redutores e de 25% no aumento da velocidade de reacção.



## Referências Bibliográficas

AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J. M. S., GAMA, M. - Engenharia Enzimática. Lisboa: Lidel-Colecção Biotec, p.1-12, 2003.

AKYOL, C. – Inactivation of peroxidase and lipoxygenase in green beans, peas and carrots by a combination of high hydrostatic pressure and mild heat treatment. The Middle East Technical University, Turkey: Master Thesis, 2004.

BARUTH, E. – Water Treatment Plant Design. American Water Works Association, American Society of Civil Engineers. 4<sup>th</sup> ed. USA: McGraw-Hill, 2005.

BÉGUIN, P., AUBERT, J. P. – The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiology Reviews, 13: 25-58 (1994).

BIERMANN, C. J. – Handbook of Pulping and Papermaking. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1996.

BRENNAN, J. G. – Food Processing Handbook. Weinheim: Wiley-VCH, Chap. 6, 2006.

BRISTOW, A., J., KOLSETH, P. – Paper Structure and Properties. New York: Marcel Dekker, Vol.8, p. 3-23, 1986.

CAMPOS, F. P. – Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. Brazilian journal of food technology, v. 6, nº2, p. 351-357, Nov/Dez. 2003.

CARVALHO, M.G.V.S. – Efeito das Variáveis de Cozimento nas Características Químicas de Pasta kraft de *Eucalyptus globulus*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra: Tese de Doutoramento, 1999.

CARVALHO, M.G.V.S., ROCHA, J. M. S. – Perspectivas para a valorização de lamas primárias na indústria de pasta. XXI Encontro Nacional da TECNCELPA / VI CIADICYP, 322-329, 2010.

CLAYTON, D., EASTY, D., EINSPAHR, D., LONSKY, W., MALCOM, E., McDONOUGH, T., SCHROEDER, L., THOMPSON, N. – Chemistry of Alkaline Pulping. Pulp and Paper Manufacture-Alkaline Pulping. Joint Executive Committee of the Vocational Educational Committees of the Pulp and Paper Industry. 5. 1, 1989.

EATON, R. A., HALE, M. D. C. – Wood: Decay, pest and protection. London: Chapman & Hall, Chap. 1, p.1-37, 1993.

EVTYUGUIN, D., ROBERT, A., ZARUBIN, M., Ya., DEINEKO, L. P. – The effect of oxygen-organosolv pulping conditions on pulp properties. Cellulose Chemistry and Technology: 105-115 (2005).

EVTYUGUIN, D. V., TOMAS, J. L., SILVA, A. M. S., NETO, Carlos P. – Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. Carbohydrate Research, 338: 597-604 (2003).

FENGEL, D., WEGENER, G. – Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, A. R. F. C., FIGUEIREDO, A. B., EVTYUGUIN, D., SARAIVA, J. A. – High pressure pre-treatments promote higher rate and degree of enzymatic hydrolysis of cellulose. Green Chemistry, 13: 2764-2767 (2011).

FERREIRA, A.R.F.C. – Efeito do tratamento hiperbárico na hidrólise de pasta *kraft* com celulase. Universidade de Aveiro, Aveiro: Tese de Mestrado, 2010.

FIGUEIREDO, A., EVTYUGUIN, D., SARAIVA, J. – Effect of high pressure treatment on structure and properties of cellulose in eucalypt pulps. Cellulose, Vol. 17, 17(6): 1193-1202 (2010).

GUERRERO-BELTRAN, J. A.; BARBOSA-CANOVAS, G.; SWANSON, B. G. – High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. Food Reviews International. Vol. 21, n.º 4, p. 411-425 (2005).

GUILBAULT, G. G. – Enzymatic Methods of Analysis. Oxford: Pergamon Press, p.2-24, 1973.

HAKKILA, P. – Structure and properties of wood and woody biomass. Seppo Kellomäk: Fapet Oy, 2. 117, 1999.

HENRIKSSON, G., EK, M., GELLERSTEDT, G. – Wood Chemistry and Biotechnology. Berlin: De Gruyter, Vol.1, 2009.

HENRISSAT, B. – Cellulases and their interaction with cellulose. Cellulose, Vol.1: 169-196 (1994).

HON, D. N.-S., SHIRAISHI, N. – Wood and cellulosic chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 2007.

KEENEY, D. R., DeLUCA, T. H. – Biomass as an energy source for the Midwestern U.S. American Journal of Alternative Agriculture. 7(3): 137-144 (1992).

KERSTETTER, J. D., LYND, L., LYFORD, K., SOUTH, C. – Assessment of Potential for Conversion of Pulp and Paper Sludge to Ethanol Fuel in the Pacific Northwest. Washington State University, 1997.

KLEMM, D., PHILIPP, B.; HEINZE, T., WAGENKNECHT, W. – Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and analytical methods. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.

LAI, L. X. – Bioproducts from sulfite pulping: Bioconversion of sugar streams from pulp, sludge, and spent sulfite liquor. University of Washington: Master Thesis, 2010.

LISBOA, S. A., EVTYUGUIN, D. V., NETO, C. P., GOODFELLOW, B. J. – Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in Eucalyptus globulus kraft black liquors. Carbohydrate Polymers, 60: 77-85 (2005).

LORENZ, D., MORRIS, D. – How much energy does it take to make a gallon of ethanol? Minneapolis: Institute for Local Self-Reliance, 1995.

MIMMS, A. – Kraft Pulping: a compilation of notes. 2<sup>nd</sup> ed. Atlanta: Tappi Press, 1993.

MINUTI, L. – High pressure: a clean activation method for sustainable organic synthesis. RSC Green Chemistry book series. Perugia, Italy: Royal Society of Chemistry, 7, (2009).

MORITZ, J. W. – Ethanol Production from waste biomass: enzymatic hydrolysis and fermentation of sulphite pulp mill primary clarifier sludge. The University of British Columbia: Master Thesis, 1996.

MOTTA, V. T. – Bioquímica Básica. 4<sup>a</sup> ed. Brasil: Médica Missau, Cap. 3, 2003.

NETO, C. P.; EVTYUGUIN, D. – Componentes macromoleculares da madeira: composição, estrutura e comportamento durante os processos de produção de pasta para papel. Química de Polímeros. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra: 545-568, 2004.

NETO, C. P., EVTYUGUIN, D., PINTO, P.C., SILVESTRE, A.J.D., FREIRE, C.S.R. – Química da madeira de *Eucalyptus globulus*: especificidades e impacto nos processos de cozimento e branqueamento. *Pasta e Papel*, 7: 32-42 (2005).

NJOROGE, D. M. – Headspace fingerprinting as a tool to compare the impact of heat and high pressure processing on carrot quality. Katholieke Universiteit Leuven, Universiteit Gent: Master Thesis, July, 2011.

OHLSSON, S. – Production equipment for commercial use. *High Pressure Processing of Foods*. Nottingham University Press, Nottingham: 167, 1995.

OHLSSON, K. A. – Carbonation of wood ash recycled to a forest soil as measured by isotope ratio mass spectrometry. *Soil Science Society of America Journal* 64(6): 2155-2161 (2004).

OLIVEIRA, S. C. T., FIGUEIREDO, A. B., EVTYUGUIN, D., SARAIVA, J. A. – High pressure treatment as a tool for engineering of enzymatic reactions in cellulosic fibres. *Bioresource Technology*. 107: 530-534 (2011).

PINTO, P.C., EVTYUGUIN, D. V., NETO, C. P., SILVESTRE, A. J. D. – Behaviour of *Eucalyptus globulus* lignin during kraft pulping. I. Analysis by chemical degradation methods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 22: 93-108 (2002).

PINTO, P.C., EVTYUGUIN, D. V., NETO, C. P. – Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft pulping. *Carbohydrate Polymers*, 60: 489-497 (2005a).

PINTO, P.C., EVTYUGUIN, D. V., NETO, C. P. – Effect of structural features of wood biopolymers on hardwood pulping and bleaching performance. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44: 9777-9784 (2005b).

RAHMAN, M. S. – *Handbook of Food Preservation*. New York: Marcel Dekker, 1998.

REBUZZI, F., EVTYUGUIN, D. – Effect of Glucuronoxylan on the Hornification of *Eucalyptus globulus* Bleached Pulps. *Macromol. Symp.*, 232: 121-128 (2006).

SEQUEIRA, S. M. S. C. – Síntese e caracterização de materiais híbridos do tipo orgânico/inorgânico com base em fibras de celulose. Universidade de Aveiro, Aveiro: Tese de Mestrado, 2005.

SCOTT, G. M., SMITH, A. – Sludge characteristics and disposal alternatives for the pulp and paper industry. Proceedings of the 1995 International environmental conference, May 7-10. Atlanta: 269-279 (1995).

SIXTA, H. – Handbook of pulp. Weinheim: Wiley-VCH, Vol. 1, 2006.

SJÖSTRÖM, E. - Wood Chemistry, Fundamentals and Applications. London, U.K.: Academic Press, 1981.

SJÖSTRÖM, E. - Wood Chemistry, Fundamentals and Applications. London, U.K.: Academic Press, 1984.

SJÖSTRÖM, E. - Wood Chemistry, Fundamentals and Applications. London, U.K.: Academic Press, 1993.

SMOOK, G. A. - Handbook for Pulp & Paper Technologist, 3<sup>rd</sup> ed. Vancouver: Angus Wilde Publications Inc., 2002.

STRAUB, C., BOND G., PROBER, R. - Practical handbook of environmental control. Cleveland: CRC Press, 1989, 259-269.

SOUSA, H. M. P. D. - Aplicação de celulases e xilanases na reciclagem de fibras de papel. Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho, Braga: Tese de doutoramento, 2002.

TAYLOR, K. B. – Enzyme Kinetics and Mechanisms. USA: Kluwer Academic Publishers, 2004.

## **Referências Electrónicas**

DEPARTAMENTO ENGENHARIA QUÍMICA UNIVERSIDADE DE COIMBRA –  
Portal de Laboratórios Virtuais de Engenharia Química. [Em linha]. Coimbra: EQ-UC.  
[Consult. 18 Jun. 2012]. Disponível em WWW: <URL:  
[http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=96&Itemid=201#5](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=96&Itemid=201#5)>.



## Apêndices

## Anexo A – Exemplos de Cálculo

### A.1 Determinação de massa de amostra em base seca necessária nas pesagens

$$W = \frac{massa_{que\ se\ pretende\ pesar} - massa_{em\ base\ seca}}{massa_{que\ se\ pretende\ pesar}} \times 100\%$$

$$massa_{que\ se\ pretende\ pesar} = \frac{massa_{em\ base\ seca}}{1 - \frac{W}{100}}$$

Assim, determina-se a massa de amostra necessária a um dado ensaio (contabilizando a humidade presente na mesma), que corresponde ao valor em base seca.

### A.2 Cálculo da percentagem de carbonatos na caracterização inicial das lammas primárias

$$massa_{CO_2\ libertado\ na\ calcinação} = massa_{cinzas, 525^{\circ}C} - massa_{cinzas, 900^{\circ}C}$$

Atendendo à estequiometria,

$$massa_{CaCO_3}(g) = \frac{massa_{CO_2\ libertado\ na\ calcinação} \times 100}{44,01}$$

$$\%Carbonatos = \frac{massa_{CaCO_3}}{massa_{LP\ em\ base\ seca}} \times 100$$

### A.3 Determinação da concentração dos cationes metálicos

$$[Metal](mg/mL) = \frac{[Metal]_{tal-qual} \times Factor\ Diluição}{massa_{LP\ base\ seca}}$$



#### A.4 Preparação da solução-tampão de acetato de sódio (0,05M e pH=5)

Primeiramente, é necessário determinarem-se as concentrações do ácido acético e do acetato de sódio a preparar. Assim, através da equação de Henderson-Hasselbach

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \Leftrightarrow 5 = 4,745 + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \Leftrightarrow 0,255 = \log \frac{[A^-]}{[HA]} \Leftrightarrow$$

$$[HA] + [A^-] = 0,05 \text{ M}$$

$$\Leftrightarrow \frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{0,255} \Leftrightarrow \begin{matrix} [HA] = 0,0178 \text{ M de ácido acético} \\ [A^-] = 0,0320 \text{ M de acetato de sódio} \end{matrix}$$

$$[HA] + 1,799 [A^-] = 0,05 \text{ M}$$

$C_i V_i = C_f V_f \Leftrightarrow 0,05 \times V_i = 0,0178 \times 1000 \Leftrightarrow V_i = 356 \text{ mL}$  a retirar, de ácido acético.

$C_i V_i = C_f V_f \Leftrightarrow 0,05 \times V_i = 0,0320 \times 1000 \Leftrightarrow V_i = 640 \text{ mL}$  a retirar, de acetato de sódio.

Adicionam-se 356 mL de ácido acético aos 640 mL de acetato de sódio. Se necessário, adicionar gotas de ácido acético concentrado para ajustar o pH.

##### Solução de ácido acético (0,05 M)

$$\rho = 1,05 \frac{\text{kg}}{\text{L}} = 1050 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$M(\text{CH}_3\text{COOH}) = 60,05 \text{ g/mol}$$

Tem-se 60,05g por cada mole de ácido acético, pelo que em 1050g tem-se 17,4854 mol por cada litro de solução.

$C_i V_i = C_f V_f \Leftrightarrow 17,4854 \times V_i = 0,05 \times 500 \Leftrightarrow V_i = 1,4298 \text{ mL}$  a pipetar para um balão de 500 mL.

Solução de acetato de sódio (0,05 M)

$$M(CH_3COONa) = 82,03 \text{ g/mol}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow 0,05 \text{ M} = \frac{n}{1L} \Leftrightarrow n = 0,05 \text{ mol}$$

$$m = n \times M \Leftrightarrow m = 4,1015 \text{ g de acetato de sódio a dissolver em 1000 mL de água.}$$

**A.5 Determinação da quantidade molar de açúcares formados (glucose) ao longo do tempo de reacção enzimática**

Através da equação da recta de calibração da glucose, obtém-se a concentração de glucose de cada medição no painel amostral, correspondente a cada valor de absorvância,

$$[\text{Glucose}] \text{ (mg/mL)} = \frac{\text{Abs}-b}{m} \times \text{Factor Diluição}$$

$$n^{\circ} \text{ moles}_{\text{Glucose}} (\mu\text{mol}) = \frac{[\text{Glucose}] \times V_{\text{total de solução no reactor}}}{M_{\text{Glucose}} \times \text{Factor Conversão}}$$

**A.6 Determinação da melhoria da velocidade inicial de reacção, entre os ensaios de LP referência e LP processadas a 400 MPa, 15min**

A determinação destes vectores de velocidade inicial de reacção deriva da consulta da Figura 3.6.

$$v_{01} = \frac{\Delta AR}{\Delta t} = \frac{23,3-0}{5-0} = 4,7$$

$$v_{02} = \frac{\Delta AR}{\Delta t} = \frac{29,0-0}{5-0} = 5,8$$

$$\frac{v_{02}-v_{01}}{v_{02}} \times 100\% = \frac{5,8-4,7}{5,8} \times 100\% = 24\%$$

## Anexo B – Tabelas Auxiliares

Nesta secção apresentam-se os dados finais relevantes para o tratamento dos resultados obtidos.

### ▪ Caracterização Química das Lamas Primárias

**Tabela B.1:** Massas necessárias à determinação do teor de humidade das lamas iniciais e tratadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HCl}$ , antes e após extracção com acetona.

Amostra / Massa (g)	$m_{\text{copos}}$	$m_{\text{LP}} \text{ pesada}$	$m_{\text{LP}} \text{ pesada após } 105^\circ\text{C}$
LP inicial	48,4955	10,0472	4,5772
	44,8875	10,1549	4,7431
LP $\text{H}_2\text{SO}_4$	37,2641	10,0114	6,8273
	28,9214	10,0053	6,7904
LP $\text{H}_2\text{SO}_4$ após extracção	19,1704	5,0044	4,2363
	19,0746	5,035	4,2716
LP $\text{HCl}$	32,6388	5,0075	3,4466
	32,1720	5,0042	3,5100
LP $\text{HCl}$ após extracção	32,6497	2,0010	1,8520
	32,6416	2,0160	1,8774

**Tabela B.2:** Massas necessárias à determinação do teor de cinzas e carbonatos, a  $525^\circ\text{C}$  e a  $900^\circ\text{C}$  das lamas iniciais e tratadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HCl}$ .

Amostra/Massa(g)	$m_{\text{cadinho}}$	$m_{\text{LP}} \text{ pesada (b.s)}$	$m_{\text{LP+cadinho}} 525^\circ\text{C}$	$m_{\text{cinzas } 525^\circ\text{C}}$	$m_{\text{cinzas } 900^\circ\text{C}}$	$m_{\text{carbonatos}}$
LP inicial	45,7182	6,9301	55,2375	3,1349	1,8869	2,8357
	52,0373	7,0493	55,2375	3,2002	1,9312	2,8834
LP $\text{H}_2\text{SO}_4$	54,0365	6,4103	57,5939	3,5574	3,5289	0,06476
	57,4056	6,8155	61,1769	3,7713	3,7427	0,06499
LP $\text{HCl}$	45,7233	3,4791	45,7790	0,0557	0,0499	0,01318
	52,0403	3,4806	52,1007	0,0604	0,0541	0,01432

**Tabela B.3:** Massas necessárias à determinação do teor de extractáveis das lamas iniciais e tratadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HCl}$ .

Amostra / Massa (g)	$m_{\text{balão}}$	$m_{\text{LP}} \text{ pesada (b.s)}$	$m_{\text{balão+ex}}$	$m_{\text{extractáveis}}$
LP inicial	52,1168	10,0193	52,1886	0,0718
	60,0579	10,0377	60,1183	0,0604
LP $\text{H}_2\text{SO}_4$	52,1178	10,0189	52,9468	0,8290
	58,3862	10,0016	59,0500	0,6638
LP $\text{HCl}$	56,8632	4,8650	56,9402	0,0770
	62,4182	6,4129	62,5042	0,0860

**Tabela B.4:** Massas necessárias à determinação do teor de lenhina insolúvel (residual) das lamas tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl.

Amostra / Massa(g)	m <sub>cadinho</sub>	m <sub>LP pesada (b.s)</sub>	m <sub>cadinho+LP(fim)</sub>	m <sub>lenhina</sub>
LP H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	51,1987	2,0019	51,2426	0,04390
	49,1679	2,0062	49,2065	0,03860
LP HCl	47,6991	2,0165	47,7461	0,04700
	47,8409	2,0050	48,0191	0,1782

**Tabela B.5:** Massas necessárias à determinação do teor de lenhina solúvel das lamas tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl.

Amostra / Massa (g)	m <sub>LP pesada (b.s)</sub>	Absorvância	m <sub>lenhina</sub>
LP H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0019	0,248	0,002250
	2,0062	0,292	0,002655
LP HCl	2,0165	0,298	0,002709
	2,0050	0,255	0,002318

**Tabela B.6:** Quadro resumo dos resultados referentes à caracterização química dos três conjuntos amostrais de LP.

Parâmetros de Análise			Lamas Primárias								
			LP iniciais			LP H2SO4		LP HCl			
						Não extraídas		Extraídas	Não extraídas		Extraídas
Humidade			53,9			32,0		15,3	30,5		7,2
Teor seco			46,1			68,0		84,7	69,5		92,8
Cinzas (% base seca)		525 °C	45,3			55,5				1,7	
		900 °C	12,6			37,4				1,0	
Teor matéria orgânica (% base seca)		525 °C	54,7			44,6				98,3	
		900 °C	87,4			62,6				99,0	
Carbonatos (% base seca)			40,9			0,98				0,40	
Extractáveis (% base seca)			0,66			7,5				1,5	
Lenhina (% base seca)											
	Insolúvel						2,1			5,6	
	Solúvel						0,24			0,25	
	Total						2,3			5,9	
Açúcares Neutros (%)											
	Ramnose						4,2			0,2	
	Fucose						2,8			0,1	
	Ribose						0,1			0,1	
	Arabinose						3,9			0,2	
	Xilose						11,5			5,9	
	Manose						6,9			1,1	
	Galactose						2,9			0,1	
	Glucose			67,7			92,3				
Metais (%)											
	Potássio (K)		0,092			-			-		
	Magnésio (Mg)		0,38			0,051			0,065		
	Manganésio (Mn)		0,077			0,0038			-		
	Cálcio (Ca)		67,2			58,8			0,57		
	Ferro (Fe)		0,19			0,12			0,15		
	Sódio (Na)		2,38			0,33			-		
	Cobre (Cu)		-			-			-		

▪ **Hidrólise enzimática de LP com e sem tratamento hiperbárico**

Recta de Calibração da Glucose:  $y = 0,7313x - 0,0124$

**Tabela B.7:** Dados relevantes da mistura reaccional.

V <sub>Solução Tampão</sub> (mL)	[Celulase] <sub>Solução-mãe</sub> (mg/mL)	V <sub>Celulase reactor</sub> (mL)	V <sub>reactor_início</sub> (mL)	M(Glc) (mg/mmol)
6,8	12	1,2	(6,8 + 1,2 =) 8,0	180,16

**Tabela B.8:** Valores normalizados das curvas integrais, referentes aos resultados das hidrólises enzimáticas das LP referência, LP após extracção com acetona sem e com processamento hiperbárico a 400 MPa, 15min.

Tempo(min)	Abs	[Glc] <sub>μmol</sub>	Abs	[Glc] <sub>μmol</sub>	Abs	[Glc] <sub>μmol</sub>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,0260	23,32	0,0220	13,28	0,00800	17,36
20	0,0520	39,10	0,0340	17,63	0,0280	39,10
40	0,0785	55,19	0,0580	23,35	0,0430	55,19
80	0,111	74,93	0,0850	38,84	0,0530	74,93
120	0,127	84,34	0,109	49,05	-	-
160	0,136	89,81	0,137	56,28	0,100	84,34
180	0,141	92,59	0,147	59,41	0,105	89,81
200	0,144	94,66	0,157	63,21	0,108	92,59
	LP referência		LP após extracção		LP após extracção, 400 MPa, 15min	

**Tabela B.9:** Valores normalizados das curvas integrais, referentes aos resultados das hidrólises enzimáticas de LP a 400 MPa/15min, LP a 500 MPa/10min e LP a 400 MPa/5+5+5 min.

Tempo(min)	Abs	[Glc] <sub>μmol</sub>	Abs	[Glc] <sub>μmol</sub>	Abs	[Glc] <sub>μmol</sub>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,0155	29,04	0,000	0,000	0,0285	35,45
20	0,0370	44,00	0,0220	38,61	0,0445	49,01
40	0,0630	70,66	0,0650	59,82	0,0740	71,82
80	0,0990	96,61	0,104	79,54	0,112	96,11
120	0,132	118,5	0,143	82,72	0,135	98,71
160	0,145	132,8	0,192	86,16	0,141	102,9
180	0,168	134,5	0,209	90,40	0,149	104,1
200	0,0155	135,3	0,217	97,00	0,160	106,3
	LP a 400 MPa/15min		LP a 400 MPa/5+5+5 min		LP a 500 MPa/10min	

**Tabela B.10:** Valores normalizados das curvas diferenciais, referentes aos resultados das hidrólises enzimáticas das LP referência, LP após extracção com acetona sem e com processamento hiperbárico a 400 MPa, 15min.

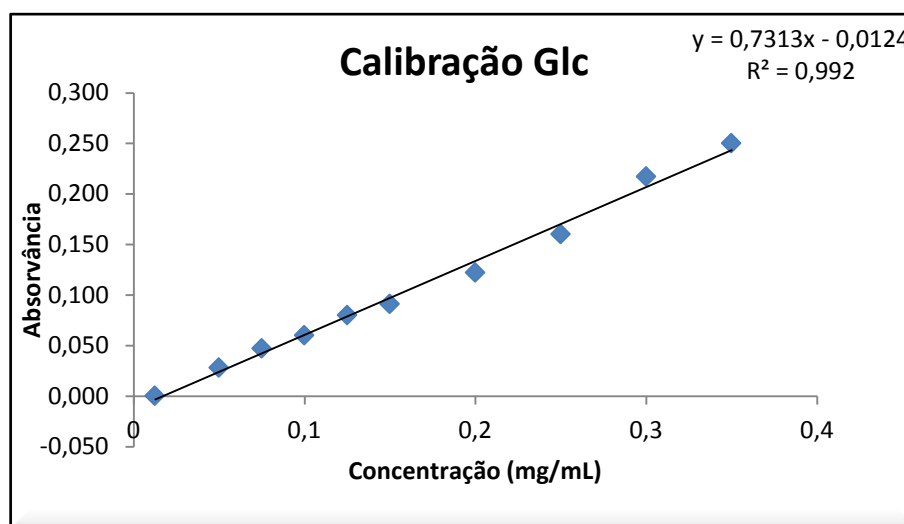
Tempo(min)	$\Delta t$	$\Delta AR$	$\Delta AR/\Delta t$	$\Delta AR$	$\Delta AR/\Delta t$	$\Delta AR$	$\Delta AR/\Delta t$
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	5,00	23,32	4,663	13,28	2,656	17,36	3,472
20	15,00	15,79	1,053	4,353	0,2902	21,74	1,450
40	20,00	16,09	0,8045	5,719	0,2859	16,09	0,8045
80	40,00	19,73	0,4934	15,489	0,3872	19,73	0,4934
120	40,00	9,412	0,2353	10,206	0,2552	-	-
160	40,00	5,465	0,1366	7,233	0,1808	9,412	0,2353
180	20,00	2,781	0,1390	3,134	0,1567	5,465	0,1366
200	20,00	2,077	0,1038	3,794	0,1897	2,781	0,1390
		<b>LP referência</b>		<b>LP após extracção</b>		<b>LP após extracção, 400 MPa, 15min</b>	

**Tabela B.11:** Valores normalizados das curvas diferenciais, referentes aos resultados das hidrólises enzimáticas de LP a 400 MPa/15min, LP a 500 MPa/10min e LP a 400 MPa/5+5+5 min.

Tempo(min)	$\Delta t$	$\Delta AR$	$\Delta AR/\Delta t$	$\Delta AR$	$\Delta AR/\Delta t$	$\Delta AR$	$\Delta AR/\Delta t$
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	5,00	29,04	5,808	0,000	0,000	35,45	7,090
20	15,00	14,96	0,9974	38,61	2,574	13,56	0,9038
40	20,00	26,65	1,333	21,22	1,061	22,81	1,141
80	40,00	25,95	0,6488	19,72	0,4929	24,29	0,6073
120	40,00	21,92	0,5481	3,183	0,07960	2,593	0,06480
160	40,00	14,29	0,3573	3,446	0,08610	4,227	0,1057
180	20,00	1,722	0,08607	4,238	0,2119	1,186	0,05931
200	20,00	0,7079	0,03539	6,598	0,3299	2,227	0,1113
		<b>LP a 400 MPa/15min</b>		<b>LP a 400 MPa/5+5+5 min</b>		<b>LP a 500 MPa/10min</b>	

## Anexo C – Figuras Auxiliares

Nesta secção é apresenta-se a figura referente à curva de calibração da glucose, necessária à quantificação de açúcares redutores das lamas primárias, no decorrer de cada hidrólise enzimática.



**Figura C.1:** Curva de calibração da glucose.